

Bioaumentação aplicado ao controlo dos níveis de amoníaco em aviários

*Relatório de Projecto apresentado para a obtenção do grau de Mestre em
Processos Químicos e Biológicos*

Autor

Brigitte de Sousa Lagoa

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Orientador

Doutor Luís Miguel Moura e Castro

Instituto Superior de Engenharia de Coimbra

Coimbra, Dezembro, 2013

Without struggle there can be no progress

Frederick Douglass

Agradecimentos

Quero aqui expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que contribuíram de forma directa ou indirecta para a concretização deste trabalho.

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu orientador, Dr. Luís Miguel Moura Neves e Castro pelo seu apoio e disponibilidade no decorrer de todo o trabalho.

Quero também agradecer à Dr^a. Ana Veloso por permitir a realização de alguns ensaios deste trabalho no laboratório de microbiologia, pela disponibilidade e ajuda prestada na realização dos ensaios.

A todos os meus colegas de Mestrado que me apoiaram, em especial ao Hugo Abreu e à Helena Correia que me ajudaram nas mais diversas tarefas e tanto me ouviram reclamar.

A toda a entidade patronal da Ovopor, em especial ao Sr. Isidro Neves e seu filho Sr. Rafael Neves por permitirem realizar este trabalho nas instalações dessa empresa, por me darem as mais diversas informação sempre que era preciso. Um especial obrigado aos funcionários responsáveis pela unidade de recria da Ovopor, Ivã e Sónia, pelo apoio, companhia e pela ajuda incondicional.

A todos os amigos mais próximos, em especial à Joana Soares, à Tânia Ferreira, ao Christof Pereira, ao David Pinto e ao Roberto Faria agradeço a partilha dos bons e dos maus momentos, a inestimável compreensão, os incentivos e a amizade. Levo-vos para sempre no meu coração!

Ao Telmo agradeço todo o apoio, encorajamento, amor e amizade com que enfrentou as más disposições e as preocupações. Obrigado por estares sempre do meu lado, por exigires sempre mais de mim e por nunca me deixares desistir. O teu apoio torna todos os obstáculos mais fáceis de enfrentar.

Por último, mas não em último lugar, agradeço aos meus pais e irmã, pelo carinho, apoio, encorajamento e ajuda incondicionais durante a realização de todo o trabalho. Sem eles nada disto seria possível. Obrigada por me ajudarem a chegar aqui e pela educação que me deram.

A todos, muito obrigado!

RESUMO

Este projecto teve como principal objectivo desenvolver um estudo à escala real e laboratorial com o intuito de testar a viabilidade da suspensão biológica comercial JASS para minorar o problema da ocorrência de elevadas concentrações de amoníaco atmosférico no interior dos aviários. Pretendeu-se, assim, estudar a vantagem da utilização de microrganismos com capacidade de degradar o amoníaco ou inibir a sua formação, fixando os compostos azotados na cama de aviário e reduzindo a sua emissão atmosférica. Para o efeito, realizaram-se diversos ensaios à escala laboratorial e real numa instalação industrial, de forma a testar a eficácia da suspensão biológica.

Os ensaios laboratoriais consistiram na determinação da influência da aplicação da suspensão biológica na libertação de amoníaco em cama de aviário colocada em reator fechado ou aberto e numa coluna que permitiu a quantificação do fluxo de amoníaco libertado a diferentes cotas. Noutro conjunto de experiências, procurou-se estudar a caracterização da suspensão biológica essencialmente por técnicas de coloração e de ensaios bioquímicos. Finalmente, avaliou-se a eficácia da suspensão na inibição da transformação da ureia pela enzima urease produzida pelo microrganismo *Proteus vulgaris*.

Os ensaios à escala real decorreram nas instalações de Leiria da Ovopor - Agro-Pecuária dos Milagres, S.A., com uma área de 12500m². Realizaram-se ensaios em dois ciclos de criação, um com 30970 pintos em que não foi aplicada a suspensão em estudo e outro com 28470 pintos onde foi feita a aplicação da suspensão, como forma de validar as vantagens de aplicação do produto desenvolvido. Durante estes ensaios foi feita a monitorização das condições ambientais, da concentração e do caudal mássico de amoníaco amostrado, bem como de alguns parâmetros caracterizadores da produtividade, como sejam o peso dos animais e a mortalidade.

Apesar de não ter sido possível tirar conclusões esclarecedoras quanto à eficiência da suspensão nos estudos comparativos à escala laboratorial, quer nos ensaios em reator fechado, quer com circulação de ar, observou-se uma redução da emissão de amoníaco de cerca de 13% no estudo da determinação do fluxo de amoníaco a diferentes cotas nas experiências em que se usou a mesma cama de aviário (redução do fluxo mássico total de 32,67 mg_{NH3}/ (m².h) para 30,68 mg_{NH3}/ (m².h).

Relativamente ao ensaio de campo na recria da Ovopor verificou-se uma clara redução na emissão de amoníaco na segunda campanha, redução essa que foi particularmente relevante nas primeiras quatro semanas de criação, que correspondem ao período em que as condições de ambas as campanhas são praticamente iguais, uma vez que não se promove a ventilação da sala de recria. Constatou-se ainda que os valores mais elevados de amoníaco atmosférico registados foram de 8,2 e 4,8 ppm na 1ª e 2ª campanhas, respectivamente, que correspondem a valores claramente abaixo do valor máximo admissível previsto na legislação nacional (20ppm).

Quanto à composição da suspensão biológica JASS verificou-se que é essencialmente composta por esporos de *Bacillus sp.* e que a germinação destes esporos é favorecida quando a suspensão é diluída.

Por fim, através do estudo em meio de cultura com composição controlada, em que foi feita a avaliação da capacidade da suspensão biológica estudada inibir o processo de formação de amoníaco, confirmou-se que esta inibiu a actividade da enzima urease produzida pelo microorganismo *Proteus vulgaris* e, conseqüentemente, houve uma redução de cerca de 47% na capacidade de formação de amoníaco comparando o desempenho dos dois reactores aos quais foram adicionados este microrganismo.

Em suma, pode-se pois concluir que, com excepção dos resultados dos estudos de determinação do amoníaco libertado realizados à escala laboratorial, todas as restantes experiências indiciam que a suspensão JASS estudada tem capacidade para inibir a formação de amoníaco e, conseqüentemente, a sua libertação, provando a utilidade do produto na melhoria das condições ambientais dos aviários.

Palavras-chave:

- Amoníaco;
- Cama de aviário;
- Bioaumento;
- Bem-estar animal
- *Proteus vulgaris*

ABSTRACT

This project's main objective was to develop a study in laboratory and in full-scale in order to test the feasibility of JASS, a commercial biological suspension to mitigate the problem of high ammonia concentrations in poultry houses. It was intended to study the advantage of using microorganisms with the capacity of degrading ammonia or inhibit its formation by fixing nitrogen compounds in litter and reducing the emission of ammonia. For this purpose, various tests were carried out in laboratory and full-scale in an industrial installation, in order to test the effectiveness of the biological suspension.

The laboratory tests consisted in evaluating the influence of the application of the biological suspension in ammonia volatilization from litter placed in a closed or open reactor and quantifying the flow of ammonia released on different levels of a column. In another set of experiments, it was intended to study the composition of the biological suspension mainly by staining techniques and biochemical assays. Finally, the effectiveness of the suspension was evaluated in terms of the capacity to inhibit the conversion of urea to ammonia by the urease enzyme produced by the organism *Proteus vulgaris*.

The full scale assays took place in the facilities of Ovopor - Agro-Pecuária dos Milagres, S.A., with an area of 12500m². Experiments were performed in two breeding cycles, with 30970 chicks with no suspension applied and another study with 28470 chicks with the application of the biological suspension, with the goal of validating its efficiency. During these tests the environmental conditions, the concentration and the mass flow rate of ammonia sampled, and some productivity characterizing parameters, such as the weight and mortality of the animals, were controlled.

Although it was not possible to take insightful conclusions about the efficiency of the biological suspension in the comparative studies at laboratory scale, whether the tests in closed reactor either in airflow reactor, a reduction of 13% in ammonia emission was observed in the study of ammonia flow determination at different levels in experiments that was used similar litter (reduction of the total mass flow from 32,67mgNH₃/(m².h) to 30,68 mgNH₃/(m².h). As for the field study in the Ovopor's poultry house it was observed a clear reduction of the ammonia emission in the second breeding cycle, a reduction that was particularly significant during the first four weeks of breeding, corresponding to the period where the conditions of both breeding cycles were essentially equal, since there was no ventilation. It was also observed that the highest levels of atmospheric ammonia recorded were 8.2 and 4.8 ppm in the 1st and 2nd campaign respectively, which correspond to values significantly below of the maximum permissible under national law (20ppm).

Regarding the composition of the biological suspension JASS it was verified that it is composed essentially of *Bacillus sp.* spores and that the dilution of the suspension promotes the spore's germination.

Finally, by testing the capacity of the biological suspension to inhibit the ammonia production in growth medium with controlled composition, it was confirmed that the suspension inhibited the activity of the urease enzyme produced by the microorganism *Proteus vulgaris*, and, consequently, it reduced the ammonia production.

To sum up, it was concluded that, with the exception of the results of the studies with the aimed of determining the volatilized ammonia in laboratory scale, all the other experiments indicate that JASS suspension has the capacity to inhibit the ammonia formation and, consequently, its volatilization, proving the utility of the product to improve environmental conditions in poultry houses.

Keywords :

- Ammonia;
- Litter;
- Bioaugmentation;
- Animal welfare;
- *Proteus vulgaris*

ÍNDICE GERAL

Agradecimentos.....	V
Resumo.....	VII
Abstract.....	IX
Índice Geral.....	XI
Lista de Gráficos.....	XV
Lista de Tabelas.....	XVII
Lista de Figuras.....	XIX
Nomenclatura e Simbologia.....	XXI
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ESTRUTURA DO RELATÓRIO DE PROJECTO	1
1.2. FONTES DE EMISSÃO E IMPACTO DO AMONÍACO NA NATUREZA	2
1.3. A UNIDADE INDUSTRIAL EM QUE SE REALIZOU O ESTUDO À ESCALA REAL: A OVOPOR.....	3
1.3.1. <i>Descrição das instalações industriais em que se realizou o estudo à escala real</i>	3
1.4. CUIDADOS A TER NA CRIAÇÃO DE PINTOS	5
1.5. CARACTERÍSTICAS DA CAMA DE AVIÁRIO	5
1.6. FORMAÇÃO DE AMONÍACO NA CAMA DAS AVES	7
1.7. UTILIZAÇÃO DE MICRORGANISMOS NA DESCONTAMINAÇÃO AMBIENTAL	9
2. ESTADO DE ARTE	13
2.1. A INFLUÊNCIA DO AMONÍACO NAS AVES	13
2.2. MÉTODOS DE REDUÇÃO DA FORMAÇÃO DO AMONÍACO EM AVIÁRIOS.....	20
2.2.1. <i>Tratamento do estrume</i>	20
2.2.2. <i>Manipulação Alimentar</i>	21
2.2.3. <i>Controlo das condições ambientais do aviário</i>	22
3. ESTUDO DA LIBERTAÇÃO DE AMONÍACO NA CAMA DE AVIÁRIO.....	27
3.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	27
3.1.1. <i>Estudo da volatilização do amoníaco em reactor com circulação de ar</i>	27
3.1.2. <i>Estudo da volatilização do amoníaco em reactor fechado</i>	31
3.1.3. <i>Estudo do perfil de volatilização do amoníaco</i>	34
3.2. MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
3.3.1. <i>Estudo da volatilização do amoníaco em reactor com circulação de ar</i>	36
3.3.2. <i>Estudo da volatilização do amoníaco em reactor fechado</i>	37

3.3.3. Estudo do perfil de volatilização do amoníaco	41
4. ENSAIOS NA RECREIA DA OVOPOR	49
4.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	49
4.2. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5. CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO BIOLÓGICA INIBIDORA DA LIBERTAÇÃO DE AMONÍACO EM ESTUDO ..59	
5.1. APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE COLORAÇÃO PARA A CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO BIOLÓGICA	59
5.1.1. Procedimento experimental	60
5.1.2. Material, Reagentes e Equipamentos	64
5.1.3. Resultados e discussão	65
5.2. ESTUDO DA SUSPENSÃO BIOLÓGICA APÓS DILUIÇÃO E INOCULAÇÃO EM MEIO TSB.....	67
5.2.1. Procedimento experimental	67
5.2.2. Material Reagentes e Equipamento	69
5.2.3. Resultados e discussão	70
5.3. DESPITE DA POSSIBILIDADE DE OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO COM ORIGEM NA ÁGUA DESTILADA	72
5.3.1. Procedimento experimental	72
5.3.2. Material, Reagentes e Equipamentos	73
5.3.3. Resultados e discussão	73
5.4. DESPITE DA POSSIBILIDADE DE OCORRÊNCIA DE CONTAMINAÇÃO COM ORIGEM NA ÁGUA DESTILADA UTILIZANDO ÁGUA ESTÉRIL	75
5.4.1. Procedimento experimental	75
5.4.2. Material, Reagentes e Equipamentos	76
5.4.3. Resultados e discussão	76
5.5. INOCULAÇÃO DE PLACAS DE PETRI.....	79
5.5.1. Procedimento experimental	79
5.5.2. Material, Reagentes e Equipamentos	79
5.5.3. Resultados e discussão	81
5.6. TESTE BIOQUÍMICO PARA VERIFICAR A UTILIZAÇÃO DE FONTES DE AZOTO- TESTE DA HIDRÓLISE DA UREIA	82
5.6.1. Procedimento experimental	83
5.6.2. Material, Reagentes e Equipamentos	83
5.6.3. Resultados e discussão	84
6. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DA SUSPENSÃO BIOLÓGICA ESTUDADA INIBIR O PROCESSO DE FORMAÇÃO DE AMONÍACO PROMOVIDO PELO MICROORGANISMO <i>PROTEUS</i>	87
6.1. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	87
6.2. MATERIAL REAGENTES E EQUIPAMENTO	90
6.3. RESULTADOS	91

7. CONCLUSÕES E SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS	95
BIBLIOGRAFIA	101
ANEXOS	109

Lista de Gráficos

Gráfico 3.1- Caudal mássico de amoníaco libertado ao longo do tempo nos ensaios realizados com os reactores fechados contendo cama de aviário sem aplicação da suspensão biológica (R1), com aplicação de suspensão biológica e água (R2) e com aplicação apenas da suspensão biológica (R3).	38
Gráfico 3.2 - Massa de amoníaco libertada ao longo do tempo nos ensaios realizados com os reactores fechados contendo cama de aviário sem aplicação da suspensão biológica (R1), com aplicação de suspensão biológica e água (R2) e com aplicação apenas da suspensão biológica (R3).	39
Gráfico 3.3 - Massa de amoníaco libertado ao longo da experiencia, nos ensaios realizados a 25°C com os reactores fechados contendo cama de aviário com aplicação de água (R1), suspensão biológica e água (R2) e apenas suspensão biológica (R3).	40
Gráfico 3.4 -.Fluxo total de amoníaco difundido (em cama fresca, descongelada sem produto e descongelada com produto) a diferentes cotas de uma colun	44
Gráfico 3.5- Evolução do fluxo mássico total à cota 0m de amoníaco ao longo do tempo para cada um dos ensaios realizados.	45
Gráfico 4.1 - Taxa de mortalidade das aves nas diferentes semanas de recria.	51
Gráfico 4.2 - Evolução do ganho de peso dospintos ao longo do tempo em diferentes recrias, bem como dos valores mínimos e máximos aconselhados pela veterinária da Ovopor.	52
Gráfico 4.3 -.Evolução da concentração de amoníaco no edifício de recria e da quantidade de pintos, em cada uma das campanhas, com indicação dos momentos em que foi feita a redistribuição dos pintos pelo pavilhão de recria.	53
Gráfico 4.4 - Razão entre a concentração de amoníaco volatilizada em partes por milhão e o nº de pintos em milhares de pintos nas duas campanhas	54
Gráfico 6.1 – Concentração de compostos azotados (expressos como NH ₃) determinados no meio de cultura (em cima) e na solução absorvente de ácido bórico a 1% (em baixo), após o período de 72h de borbulhamento.	91

Lista de Tabelas

Tabela 2.1- Resumo bibliográfico relativo ao efeito da amónia nas aves.	16
Tabela 3.1- Material, reagentes e equipamentos utilizados na execução dos trabalhos laboratoriais	35
Tabela 3.2- Cálculos efectuados para a determinação da quantidade de amoníaco absorvida pelas soluções de ácido bórico nas amostras recolhidas.....	37
Tabela 4.1 - Material, reagentes e equipamentos utilizados para a determinação da concentração de amoníaco na unidade de recria.	51
Tabela 5.1- Reagentes utilizados nas técnicas de coloração e respectivas características	64
Tabela 5.2- Material e equipamentos utilizados nas técnicas de coloração	65
Tabela 5.3- Reagentes utilizados para a preparação dos meios de cultura TSB com o inóculo da suspensão biológica em estudo e suas características.....	69
Tabela 5.4- Material e equipamentos utilizados para a preparação dos meios de cultura TSB com o inóculo da suspensão biológica em estudo	69
Tabela 5.5- Reagentes utilizados para a inoculação das placas de Petri com agar de Muller-Hinton e suas características.....	79
Tabela 5.6- Material e equipamentos utilizados para inoculação das placas de Petri com agar de Muller-Hinton	80
Tabela 5.7- Tabela de resultados das inoculações em caixas de Petri.....	81
Tabela 5.7- Reagentes utilizados no teste da hidrólise da ureia e suas características.....	83
Tabela 5.8- Materiais e equipamentos utilizados no teste da hidrólise da ureia	83
Tabela 6.1- Descrição do conteúdo de cada um dos meios de controlo utilizados	89
Tabela 6.2- Reagentes utilizados na realização experimental, e suas respectivas características	90

Lista de Figuras

Figura 1.1- Fotografia das instalações da Ovopor.....	3
Figura 1.2- (Esq.) Sistema de alojamento dos pintos nas duas primeiras semanas de vida; (dir.) fotografia do interior do pavilhão de recria da Ovopor.....	4
Figura 1.3 - (Esq.) Sistema de aquecimento a gás utilizado na recria da Ovopor; (dir.) sistema de ventilação.....	4
Figura 1.4 - (Esq.) Fotografia de cama de aviário (fonte: ACRLSSUL, 2014); (dir.) Aplicação de serradura nas fossas da recria da Ovopor.....	6
Figura 1.5- Degradação aeróbica do ácido úrico. Adaptação de Bachrach (1957), Volgels e Van Der Drift (1976) e Carlile (1984).....	8
Figura 1.6- Suspensão biológica JASS, utilizada durante este trabalho e sua preparação conforme os dados do fornecedor.....	10
Figura 3.1 - Esquema representativo da instalação utilizada na determinação do amoníaco volatilizado.....	28
Figura 3.2- Esquema representativo da forma como era aplicada a suspensão biológica diluída, de modo a assegurar que a humidade adicionada a cada reactor ser semelhante.....	29
Figura 3.3- Fotografia da instalação laboratorial usada na determinação do amoníaco volatilizado da cama de aviário contido em reactores em banho termostatzado (visão lateral).	30
Figura 3.4 - Fotografia da instalação laboratorial usada na determinação do amoníaco volatilizado da cama de aviário contida em reactores em banho termostatzado.....	30
Figura 3.5 - Reactor utilizado para determinar o amoníaco volatilizado da cama de aviário, no segundo grupo de experiências.....	32
Figura 3.6- Método de recolha de amostras e reposição de volume de solução absorvente, no segundo grupo de experiências.....	32
Figura 3.7 - Reactores em banho termostatzado... ..	33
Figura 3.8- Da esquerda para a direita: fotografia frontal da coluna utilizada durante este trabalho; recipiente utilizado para a colocação da cama de aviário e sistema de suspensão dos vials ao longo da coluna.	34
Figura 3.9- Fotografia da abertura da coluna utilizada neste ensaio laboratorial.....	35
Figura 3.10 – Fotografia do aparelho de medição do azoto total TOC/TN da Shimadzu.....	36
Figura 3.11- Esquema representativo do processo de difusão do amoníaco ao longo da coluna.	43

Figura 4.1- Esquema representativo e imagens do sistema de análise da concentração de amoníaco no pavilhão. 1- Local de amostragem do ar; 2- Percurso do ar desde o ponto de colheita até ao sistema de absorção; 3- Percurso do ar isento de amoníaco desde o sistema de absorção até à bomba de ar.	50
Figura 5.1 - Procedimento experimental da técnica de coloração com azul-de-metileno.	60
Figura 5.2- Quatro etapas principais do método de coloração Gram.....	62
Figura 5.3- Lâmina corada com verde malaquita... ..	63
Figura 5.4 - Método de fixação do corante verde malaquita.	64
Figura 5.5- Fotografia dos dois matrizes colocados a incubar (1); à esquerda o matraz inoculado com suspensão concentrada, e à direita com suspensão diluída a 12.8%. Por baixo (2) é evidenciada a maior turbidez do matraz com suspensão diluída. (3) Fotografia dos matraz colocado à temperatura ambiente inoculado com suspensão biológica concentrada.	68
Figura 5.6- Representação das imagens observadas ao microscópio ampliado 1000x (de cima para baixo e da esq. para a dir.): inoculação com suspensão concentrada a 30°C, inoculação com suspensão biológica diluída a 30°C, inoculação com suspensão diluída à T _{ambiente} e por fim, suspensão diluída sem meio de cultura à T _{ambiente}	71
Figura 5.7 - Fotografia dos três matrizes após incubação por 48h. À esquerda o matraz inoculado com suspensão concentrada, no meio o matraz inoculado com suspensão diluída 12.8% e, por fim, à direita o matraz inoculado com água destilada.	73
Figura 5.8- Representação das imagens observadas ao microscópio ampliado 1000x (da esquerda para a direita): inoculação com suspensão concentrada (A), inoculação com suspensão diluída a 30°C (B) e por fim inoculação com água destilada (C).....	74
Figura 5.9- Matrizes após incubação por 24h a 30°C. Matrizes inoculados com (da esquerda para a direita) suspensão biológica diluída em água destilada, suspensão biológica diluída em água destilada estéril, suspensão biológica concentrada, água destilada e por fim água destilada estéril.....	76
Figura 5.10 - Representação das imagens observadas ao microscópio ampliado 1000x (de cima para baixo e da esq. para a dir.) dos meios de crescimento inoculados com: suspensão diluída em água destilada, suspensão diluída em água destilada estéril, suspensão concentrada e por fim água destilada estéril... ..	78
Figura 5.11 - Fotografia do tubo de ensaio contendo agar de ureia após incubação.	84
Figura 6.1 - Esquema representativo do sistema de captura do amoníaco produzido nos meios de controlo.....	88
Figura 6.2 - Fotografia dos quatro sistemas de borbulhamento com os quatro meios de controlo.	88

Nomenclatura e Simbologia

Abreviatura	Designação
C_A	Concentração da espécie A
D	Diâmetro
D_{AB}	Coeficiente de difusão da espécie A em B
EPA	United States Environmental Protection Agency
H_2SO_4	Ácido Sulfúrico
H_3BO_3	Ácido Bórico
J_A	Fluxo de difusão da espécie A
m_A	Massa de amoníaco que existiria na amostra
m_{abs}	Massa de amoníaco absorvido no período de amostragem
NH_3	Amoníaco
NH_4^+	Amonião
TN	Azoto Total
TOC	Carbono orgânico Total
TSB	Triptona de Soja
V_A	Volume da espécie A
Δt	Intervalo de tempo

Cap.1- Introdução



1. Introdução

No presente capítulo, após a apresentação da estrutura do Relatório de Projecto, faz-se a introdução ao trabalho, apresentando-se informações gerais e breves noções sobre o funcionamento de um aviário, como a libertação de amoníaco afecta a sua operacionalização e como se forma o amoníaco na cama de aviário. Apresenta-se, ainda a descrição da empresa em que se desenvolveu o estudo de campo e faz-se uma abordagem sucinta ao tema do bioaumento.

1.1. Estrutura do Relatório de Projecto

O relatório de projecto encontra-se dividido em seis capítulos principais.

No segundo capítulo é apresentada uma revisão bibliográfica onde se faz a caracterização do estado da arte em termos do efeito do amoníaco nas aves e métodos de redução da formação do amoníaco em aviários.

Os terceiro, quarto, quinto e sexto capítulos são referentes aos vários trabalhos práticos realizados:

3º Capítulo – Estudo da libertação do amoníaco volatilizado em cama de aviário, em que se procurou avaliar à escala laboratorial o efeito da aplicação de uma suspensão microbiológica na libertação de amoníaco pela cama de aviário;

4º Capítulo – Ensaio de campo na recria da Ovopor, em que se apresentam os resultados das duas campanhas de monitorização da concentração do amoníaco, do peso e da mortalidade das aves, em que apenas na segunda campanha foi adicionada a suspensão biológica em estudo, com o intuito de avaliar a capacidade da mesma inibir a produção de amoníaco.

5º Capítulo – Caracterização da suspensão biológica inibidora da libertação de amoníaco, em que se procedeu a um estudo microbiológico com vista à obtenção de informações sobre a composição e modo de funcionamento da suspensão estudada.

6º Capítulo – Avaliação da capacidade da suspensão biológica estudada inibir o processo de formação de amoníaco pelo microorganismo *Proteus*, em que se utilizou um meio de composição controlada de forma a garantir que todos os ensaios numa etapa inicial apresentassem a mesma quantidade de compostos azotados.

Em cada um destes capítulos são apresentados o procedimento experimental seguido para a realização de cada experiência, os materiais e métodos utilizados, bem como os resultados e a sua discussão.

Por fim, no sétimo capítulo faz-se uma súmula das principais conclusões retiradas dos estudos efectuados e apresentam-se algumas sugestões para trabalhos futuros.

1.2. Fontes de emissão e impacto do amoníaco na natureza

O amoníaco é um composto constituído por um átomo de nitrogénio e três átomos de hidrogénio. Este composto é um dos mais abundantes compostos azotados na atmosfera. Pode-se encontrar na forma ionizada (amónio, NH_4^+) e na forma não ionizada (amoníaco, NH_3). Sendo este último um gás com carácter básico, desempenha um papel de extrema importância na neutralização das espécies gasosas e particuladas de carácter ácido existentes na atmosfera (Natalie *et al.*, 2003). Contudo, quando em concentrações elevadas, também representa um grande problema não só para o ambiente, como também para a saúde do homem e dos animais. Um dos problemas mais significativos do amoníaco na atmosfera reside no facto de serem precursores da formação de pequenas partículas secundárias que estão na origem de problemas respiratórios, cardiovasculares e morte prematura devido à penetração e deposição das mesmas na região alveolar dos pulmões. No caso dos ecossistemas aquáticos, o aumento da concentração de azoto pode levar à eutrofização, que é um processo no qual o excesso de nutrientes na água conduz a um grande crescimento de vida vegetal, que, consequentemente, dificultará ou poderá mesmo extinguir a vida aquática devido à falta de oxigénio.

As principais fontes de emissão deste gás são os locais de criação de animais, os fertilizantes, o solo fertilizado, incêndios florestais, a queima de resíduos, a indústria dos compostos azotados, o tráfego rodoviário, os oceanos e os próprios seres humanos. De acordo com um estudo realizado por Strader *et al.* (2002) nos Estados Unidos, no ano de 1995 o gado foi a principal fonte de amoníaco, representando cerca de $3,4 \times 10^9$ kg, enquanto os fertilizantes, os seres humanos, o tráfego e a indústria representaram apenas $7,7 \times 10^8$ kg, $1,1 \times 10^8$ kg, $4,7 \times 10^8$ kg e $7,0 \times 10^7$ kg, respectivamente. Um estudo realizado pela EPA (2004) verificou que a indústria agrícola nos Estados Unidos, em particular a criação de gado bovino, suíno e avícola são as fontes mais significativas de emissão atmosférica de amoníaco, representando cerca de 2,4 milhões de toneladas anuais. Um outro estudo realizado por esta mesma agência estimou que só no ano de 2002 nos Estados Unidos o gado leiteiro emitiu 558.094 toneladas de amoníaco, o gado de corte e novilhos 656.648 toneladas, os suínos 429.468 toneladas e por fim as aves 664.238 toneladas de amoníaco para a atmosfera (EPA, 2004).

1.3. A unidade industrial em que se realizou o estudo à escala real: a Ovopor

A Ovopor - Agro-Pecuária dos Milagres, S.A. é uma empresa que se encontra localizada em Leiria desde 1984, ano em que foi fundada. A Ovopor dedica-se não só à produção de ovos de galinhas poedeiras no sector avícola, como também ao fabrico e comercialização de rações para animais.

O sector avícola é constituído por 9 pavilhões de postura com um efectivo animal de aproximadamente 230,000 galinhas poedeiras e 2 pavilhões de recria com 67,000 frangas aproximadamente. Todas as instalações animais se encontram equipadas por forma a cumprir as normas de bem-estar animal previstas no Decreto-Lei nº 72-F/2003, de 14 de Abril. Assim, a instalação encontra-se



Figura 1.1 - Fotografia das instalações da Ovopor.

controlada não só em termos de intensidade e duração da iluminação, como também ao nível da densidade populacional, da qualidade do ar, da interacção entre humanos e frangos de forma a reduzir o *stress*, entre outros parâmetros.

1.3.1. Descrição das instalações industriais em que se realizou o estudo à escala real

Este estudo realizou-se nas instalações da Ovopor - Agro-Pecuária dos Milagres, S.A. Foi no edifício de recria, com capacidade para cerca de 30.970 pintos e uma dimensão de 12500 m² onde foi monitorizada a humidade e temperatura atmosférica durante o ciclo de criação das aves. Por forma a caracterizar a produtividade das aves, foi também registado o peso de alguns animais de forma aleatória de forma a ter uma amostra representativa do bando.

A unidade de recria era dividida em 4 fileiras de gaiolas com uma dimensão de 0.40 m de altura, 1.07 m comprimento e 1.04 m de largura (figura 1.2). Na base de cada uma destas fileiras de gaiolas existe uma fossa com 2.08 m de largura e com cerca de 998m de comprimento, onde fica depositada a cama de aviário composta por serradura, excrementos e urina dos pintos, restos de ração e penugem. A água era fornecida em bebedouros de forma automática para evitar o derramamento e o alimento só após as 2 semanas de criação é que passou a ser fornecido automaticamente, sendo que inicialmente era dispensado em comedouros (figura 1.2).



Figura 1.2 – (Esq.) Sistema de alojamento dos pintos nas duas primeiras semanas de vida; (dir.) Fotografia do interior do pavilhão de recria da Ovopor.

O edifício estava provido de um sistema de arejamento que consistia em 6 ventoinhas com uma capacidade de $36000 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ e 2 ventoinhas com uma capacidade de $18000 \text{ m}^3\text{h}^{-1}$ (figura 1.3) Este sistema era regulado de forma manual tendo em conta as condições ambientais da sala da recria. Durante pelo menos as quatro primeiras semanas de vida dos pintos estes ventiladores encontram-se desligados por forma a evitar a diminuição da temperatura atmosférica. A temperatura no interior da recria era controlada tanto pelas ventoinhas como também pelos aquecedores a gás (figura 1.3), de modo a manter uma temperatura de aproximadamente 32°C nas primeiras semanas, 27°C a partir das duas semanas iniciais, 23°C na quarta semana e por fim 18°C durante o fim do período de criação. Para a regulação da humidade, um sistema de controlo automático activava os nebulizadores que existiam no interior do edifício, que pulverizavam água de forma a aumentar a humidade atmosférica quando esta apresentava valores baixos.

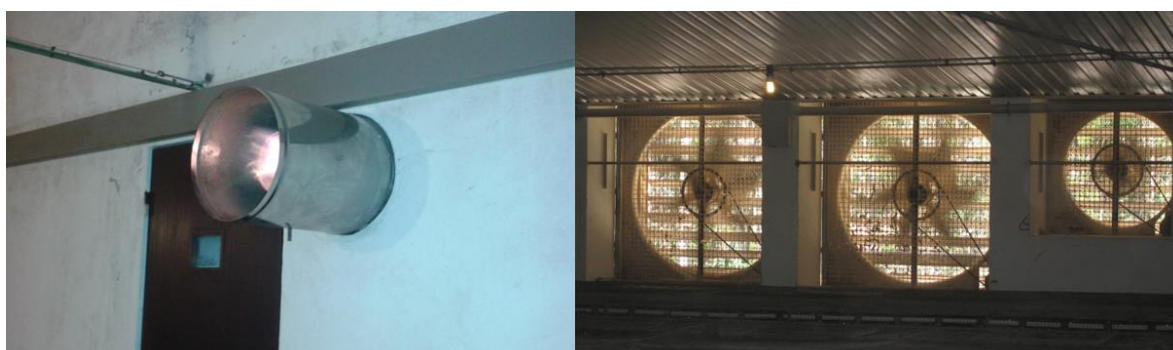


Figura 1.3- (Esq.) Sistema de aquecimento a gás utilizado na recria da Ovopor; (dir.) Sistema de ventilação.

1.4. Cuidados a ter na criação de pintos

O conforto térmico nomeadamente nas duas primeiras semanas de vida das aves é de extrema importância, uma vez que a sua capacidade de termorregulação ainda não está bem desenvolvida (Baêta *et al.*, 2000). Assim sendo, principalmente nas primeiras semanas, as aves necessitam de uma temperatura ambiente elevada de forma a manter a temperatura corporal o mais constante possível. Uma outra razão pela qual é tão importante manter a temperatura elevada reside no facto de que para que a troca gasosa nos pulmões dos pintos seja eficiente é necessário que a diferença entre a temperatura ambiente e corporal seja mínima (Franco e Fruhauff, 1997; Correia, 2010). Quando sujeitos a temperaturas abaixo da zona de conforto, parte da energia produzida pela ingestão de alimento é utilizada para a geração de calor de forma a manter a temperatura corporal. A utilização da energia para a manutenção do sistema termorregulador conduz a uma redução no crescimento e, consequentemente, na produtividade da instalação (McDowell, 1974)). Em contrapartida, quando sujeitos a temperaturas acima da zona de conforto as aves podem entrar em hipertermia ou sofrer de desidratação, o que irá conduzir ao accionamento do sistema de refrigeração, em que há uma redução do consumo de alimento, e consequente redução quer no crescimento, quer na produtividade (Mickelberry *et al.*, 1966).

1.5. Características da cama de aviário

A cama de aviário é o nome dado à mistura do material absorvente seleccionado pelo operador do aviário (casca de arroz, serradura, *etc*) com os materiais liberados pela actividade das aves: penas, água e ração desperdiçada, descamações epiteliais e excrementos (Silva Pires *et al.*, 2013; Ritz *et al.*, 2005).

Principalmente nos aviários de frangos de corte, como as aves estão em constante contacto directo com a cama de aviário, as características e condições desta irão influenciar significativamente o desempenho das aves. Assim, o estado e composição da cama de aviário são um ponto importante, na medida em que aquela serve não só para absorver a humidade em excesso das fezes e da água desperdiçada dos bebedouros, como também para incorporar as fezes de forma a reduzir o contacto entre as aves e o esterco e, por fim, para reduzir as oscilações de temperatura e proporcionar o amortecimento do diferencial de temperatura existente entre as aves e o chão, contribuindo desta forma para o maior conforto dos frangos (Ritz, *et al.*, 2005; Nääs, *et al.* 2010).

Deste modo, a escolha do material de cama mais apropriado, constitui um passo fundamental na manutenção da adequada qualidade do ar dentro do aviário bem como de todo o seu ambiente (Oderkirk, 2012). Quando as condições ambientais ideais são asseguradas, as aves apresentam um melhor desenvolvimento, aumentando a produtividade da instalação avícola (Garcia, *et al.*, 2010).

De forma a dar resposta a todas estas necessidades, o material utilizado na cama deverá apresentar as seguintes características (Silva Pires, *et al.*, 2013):

- ✓ Boas características em termos de isolamento térmico;
- ✓ Baixo teor de humidade;
- ✓ Elevada capacidade de absorção;
- ✓ Livre de fungos e mofo;
- ✓ Ausência de toxicidade;
- ✓ Boas características no contacto com as aves, nomeadamente em termos de suavidade do material;
- ✓ Adequação à utilização posterior como fertilizante agrícola;
- ✓ Baixo custo;
- ✓ Elevada disponibilidade;
- ✓ Facilidade de transporte.



Figura1.4 – (Esq.) Fotografia de cama de aviário (fonte: ACRLSSUL, 2014); (dir.) Aplicação de serradura nas fossas da recria da Ovopor.

Alguns exemplos de materiais que respondem a estas características e que são utilizados como absorventes em aviários são a casca de arroz, casca de amendoim, feno, palhas e serradura (Garcia *et al.*, 2011). Durante a realização deste projecto, na recria onde se efectuou o estudo piloto foi utilizada serradura como material absorvente.

Independentemente do material seleccionado é necessário adoptar uma boa manutenção da cama controlando os níveis de humidade, evitando a produção de pó (no caso de baixa humidade) e minimizando a libertação de amoníaco. Deve-se, ainda, evitar a exposição a agentes transmissores de doenças e prevenir a proliferação de insectos.

A cama de aviário deve, pois, ser gerida de forma a proporcionar o máximo conforto às aves para garantir um desempenho máximo da unidade de produção e reduzir os custos operativos (Ritz *et al.*, 2005).

1.6. Formação de amoníaco na cama das aves

O amoníaco não é produzido nem excretado directamente pelas aves. A sua formação inicia-se através da ingestão de produtos ricos em proteína e que contêm compostos azotados em excesso para garantir que todas as exigências nutricionais sejam garantidas. Contudo, como nem todo o nitrogénio ingerido é convertido a produto (como por exemplo os ovos, no caso das aves), ou absorvido pelo corpo do animal, o excesso deste composto é excretado principalmente pela urina sob a forma de ácido úrico (Correia, 2010). Como as aves excretam uma mistura de urina e fezes, o ácido úrico entra imediatamente em contacto com os microorganismos presentes nas fezes, desencadeando uma série de reacções de decomposição deste composto até se obter ureia (Figura 1.5). Assim, a decomposição do ácido úrico e a consequente produção de amoníaco é o resultado de uma série de reacções em que a ureia é formada a partir de alantoína, que por sua vez é um produto de degradação do ácido úrico. Por fim, quando a enzima urease, produzida por bactérias urease positivas presentes nas fezes, se combina com a ureia, forma-se então o gás amoníaco e dióxido de carbono que são libertados para a atmosfera, diminuindo a qualidade do ar interior do aviário (Roberts, 2009; Ritz *et al.*, 2004; Carlile, 1984; Bachrach, 1957; Vogel e Van Der Drift, 1976).

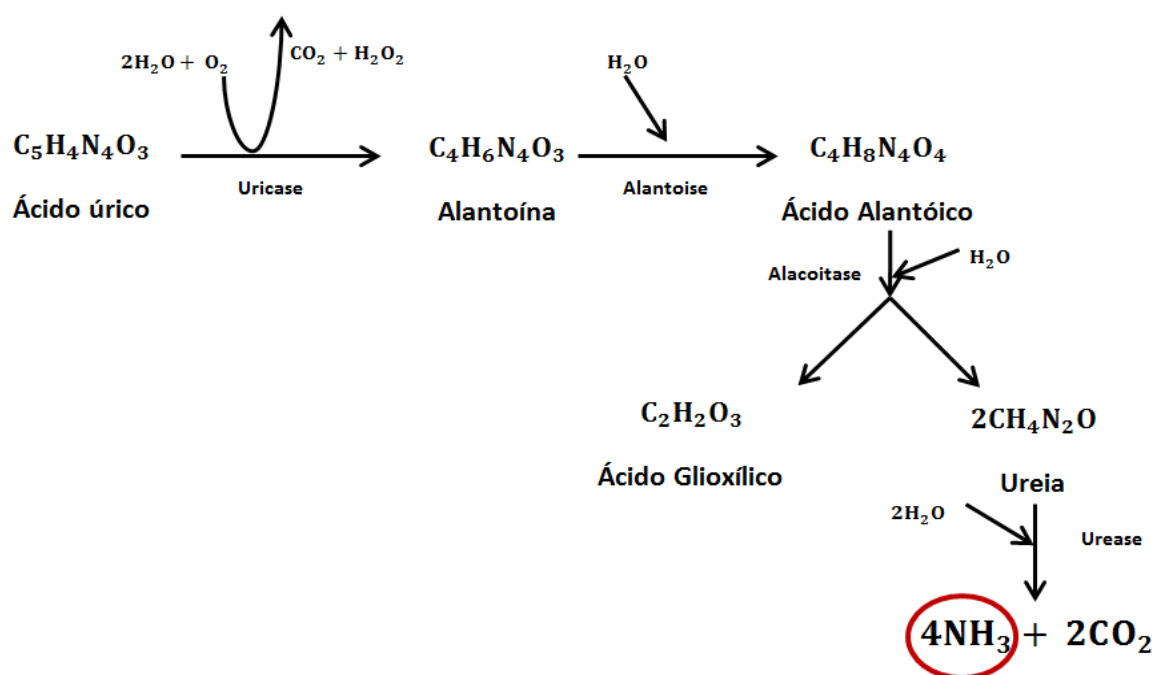
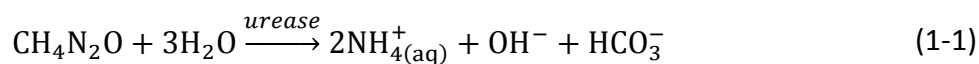


Figura 1.5- Degradação aeróbica do ácido úrico. Adaptação de Bachrach (1957), Volgels e Van Der Drift (1976) e Carlile (1984).

Contudo, o produto destas reacções nem sempre é o amoníaco gasoso. Dependendo do pH da cama pode-se formar amoníaco gasoso ou o amonião.



A hidrólise da ureia pode ocorrer tanto em condições aeróbias como anaeróbias. Assim, quando as condições são propícias ao crescimento microbiano, há uma maior disponibilidade de enzimas e por esse motivo a produção de amoníaco aumenta. Estas condições incluem altas temperaturas ($> 20^{\circ}\text{C}$) e humidades (40 a 60%), pH entre o neutro e o ligeiramente alcalino (7,0-8,5) e a presença de matéria orgânica (Ritz *et al.*, 2004; Groot e P., 1994). Todos estes factores estão comumente presentes nos aviários (Carey, 2005). Deste modo, a volatilização do amoníaco em qualquer edifício de criação/alojamento de aves pode ser altamente variável dependendo da concentração de amoníaco total, da temperatura e humidade, do pH e tempo de armazenamento do estrume. Além destes aspectos, também a quantidade de azoto presente no alimento do animal, o tamanho, idade e espécie de animal em causa podem influenciar a quantidade de amoníaco produzida (Knížatová *et al.*, 2010).

1.7. Utilização de microrganismos na descontaminação ambiental

A biorremediação é uma técnica relativamente recente que consiste no isolamento de microrganismos para elevar o rendimento de um processo de descontaminação ambiental. Este processo foi a primeira técnica a utilizar o bioaumento no tratamento de solos quando os microrganismos indígenas não têm capacidades fisiológicas de realizar a descontaminação do local ou quando a sua actividade biológica é muito reduzida. Nestas situações é feita a adição de microrganismos no local contaminado para promover a degradação dos compostos poluentes orgânicos de forma a eliminá-los por completo ou, pelo menos, a reduzir a sua concentração e/ou toxicidade, descontaminando o local em questão. Posteriormente e seguindo os mesmos princípios, esta técnica foi também adoptada no tratamento de efluentes líquidos tendo como vantagem, relativamente aos tratamentos biológicos convencionais, a especificidade dos microrganismos utilizados, o que permite uma maior eficiência de remoção dos poluentes que se pretende tratar. Pode, ainda, permitir a redução da produção de lamas, dos gastos de energia e dos maus odores.

Os microrganismos seleccionados têm de ter algumas características particulares, como por exemplo, capacidade para degradar o composto poluente em questão convertendo-o num outro composto não tóxico, serem geneticamente estáveis, apresentarem um elevado nível de actividade enzimática, possuírem a capacidade de competir com a população intrínseca do local contaminado, não serem patogénicos e, por fim, utilizarem o contaminante alvo como fonte de carbono ou azoto (Gonçalves, 2013; Souza *et al.*, 2008).

A utilização do bioaumento na redução da emissão de amoníaco em aviários, tema em que este projecto se insere, é um assunto ainda muito recente. Contudo, existem já alguns produtos biológicos em comercialização que utilizam o bioaumento para a redução de emissões de amoníaco, como é exemplo o produto Enzilimp®AV (ver catálogo informativo no anexolll) que consiste numa mistura de microrganismos (*Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus polymyxa*) em forma de esporos que actua competindo com as bactérias urease positivas. Outro exemplo é o produto MicroTreat™ "P" (ver catálogo informativo no anexo IV)) que utiliza a actividade de bactérias especificamente seleccionadas com o objectivo de controlar a decomposição de cama de aviário.

Neste projecto o produto em estudo denomina-se JASS e foi desenvolvido pela BIO-SYSTEMS EUROPE® (figura 1.6). De acordo com a ficha técnica do produto (ver catálogo informativo no anexo II), o JASS consiste numa suspensão biológica composta por bactérias estabilizadas, enzimas livres e micronutrientes, que actuam competindo pelo substrato com as bactérias já existentes na cama de aviário.



Figura 1.6 - Suspensão biológica JASS, utilizada durante este trabalho e sua preparação conforme os dados do fornecedor.

Cap.2-Estado de Arte



2. Estado de Arte

Neste capítulo é apresentado o estado de arte dos aspectos técnicos mais específicos do presente trabalho: o efeito que esta provoca nas aves e os métodos existentes para atenuar a formação de amoníaco em aviários.

2.1. A influência do amoníaco nas aves

A influência da presença do amoníaco na atmosfera interior dos aviários tem sido um tema muito estudado. As aves de capoeira estão sujeitas a uma exposição de amoníaco atmosférica típica na ordem dos 50ppm. Em Portugal, a concentração de amoníaco (NH_3) não pode ser superior a 20ppm (Decreto-Lei 79/2010 de 25 de Junho), sendo esta medição feita ao nível da cabeça dos frangos. Contudo, mesmo quando expostos durante longos períodos a esta concentração de NH_3 (20ppm), os animais podem desenvolver uma variedade de sintomas adversos, nomeadamente o aumento da espessura da cavidade auricular pulmonar, a deterioração das membranas mucosas da traqueia, a ocorrência de lesões oculares, a redução do peso e produtividade das aves, etc. De seguida apresentam-se os principais estudos realizados sobre esta temática.

O efeito do amoníaco atmosférico sobre o desempenho do crescimento e resposta imunológica de pintos foi estudado por vários autores. Wang *et al.* (2010) realizaram um estudo onde 480 pintos com 1 dia de idade foram aleatoriamente dividido em 4 grupos e sujeitos a um tratamento de 0, 13, 26 e 52 ppm de amoníaco. Os autores concluíram que os pintos que tinham sido sujeitos a uma atmosfera de 52ppm de amoníaco apresentaram uma maior redução de peso do que o grupo de controlo (0 ppm). Concluiu-se também que nos pintos expostos a 26 e 52 ppm de amoníaco os níveis dos anticorpos responsáveis pela inibição da hemaglutinação foram significativamente menores do que o grupo de controlo, o que indica que as elevadas concentrações de amoníaco conduzem a redução da resposta imunológica. Já num outro estudo realizado por Anderson e co-autores (1964) concluiu-se que a exposição a 20 ppm de amoníaco durante 72horas ou de 50 ppm durante 48horas conduz a um aumento na taxa de galinhas infectadas com a doença de Newcastle quando expostas a um aerossol do vírus desta doença. Assim, ambos os estudos apontam para uma redução na resposta imunológica nas aves expostas a este gás quando a sua concentração é superior a 20ppm.

Num estudo onde foi avaliado o efeito de diferentes níveis de amoníaco sobre o desempenho e termorregulação de frangos de corte (Yahav, 2004), verificou-se que o ganho de peso foi reduzindo significativamente à medida que se aumentava a concentração deste

composto. Foi também possível apurar que os frangos expostos à menor concentração de amoníaco (16 ppm) apresentavam uma maior eficiência de alimentação e regulavam melhor a temperatura corporal do que aqueles que se encontravam expostos a concentrações de NH_3 mais elevadas. Estes resultados foram corroborados pelos estudos de Beker *et al.* (2004) Miles *et al.* (2004) e Reece *et al.* (1980). No estudo do grupo de Beker verificou-se uma diminuição significativa na relação entre o peso dos frangos e a alimentação em aves expostas a uma concentração de 60ppm comparativamente aos frangos expostos a níveis de amoníaco de apenas 30 ppm. Os resultados de Miles *et al.* (2004) revelaram que os pesos corporais ao fim de 4 semanas de exposição foram reduzindo entre 6 e 9% nos grupos de aves expostas a 50 e 75ppm de NH_3 respectivamente. Por fim, no estudo de Reece *et al.* (1980) concluiu-se que quando expostas a altas concentrações de amoníaco, as aves apresentam um peso corporal e uma conversão alimentar significativamente inferior (superiores a 8%) quando comparado com as aves a 0ppm deste gás.

A investigação do efeito do amoníaco nas vias respiratórias foi realizada por Al-Mashhadani, Charles e Oyetunde. No estudo denominado “Effect of atmospheric ammonia on the surface ultrastructure of the lung and trachea of broiler chickens” Al-Mashhadani demonstrou que as galinhas que se encontravam expostas a 100 ppm de amoníaco apresentavam uma maior quantidade de células secretoras de muco e pontos hemorrágicos quando comparados com as galinhas expostas a 0, 25, 50 e 75 ppm. Verificou-se também uma maior espessura de parede da traqueia nas aves expostas a 75 e 100 ppm do que nas aves de controlo. Para a determinação dos efeitos das altas concentrações de amoníaco, Charles e Payne (1966) expuseram vários grupos de frangos de corte a concentrações na ordem dos 0, 53, 78 e 100 ppm de amoníaco. Neste estudo concluiu-se que quando expostos a 100 ppm de amoníaco, os frangos apresentam uma redução entre 7e 27% na taxa de respiração, bem como menor produção de dióxido de carbono e profundidade respiratória. Além disso, os frangos expostos a ambientes com altas concentrações de amoníaco tendem a comer menos alimento e a apresentar menor taxa de crescimento do que frangos de corte criados em ambientes livre de amoníaco. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Oyetunde (1978), onde sete grupos de 12 frangos foram expostos no interior de uma câmara de controlo de forma contínua durante 4 semanas a aerossóis de gás amoníaco, poeira e *E.coli*, de forma isolada e combinada. Neste estudo concluiu-se que as aves expostas a amoníaco isolada ou em combinação com *E.coli* ou o pó, mesmo durante curtos períodos de tempo apresentavam lesões nos sacos aéreos. Quando combinados os três factores: o pó, a amoníaco e a *E.coli* verificou-se que ocorriam lesões pulmonares.

A ocorrência de lesões oculares devido à exposição de amoníaco atmosférica foi avaliada através de um estudo realizado por Olanrewaju *et al.* (2007), onde se avaliou a influência da amoníaco e da intensidade de luz no aparelho ocular dos pintos. Foi possível

demonstrar que as lesões oculares apresentavam um maior agravamento quando os frangos eram expostos a maiores concentrações de amoníaco e intensidade de luz.

Tabela 2.1 - Resumo das referências bibliográficas utilizadas no estudo do estado da arte sobre o efeito do amoníaco nas aves.

Referência bibliográfica	Título	Objectivos	Descrição do método	Resultados
Reece <i>et al.</i>, 1980	Ammonia in the atmosphere during brooding affects performance of broiler chickens	Determinar o efeito de diferentes níveis de amoníaco sobre a eficiência da produção de frangos de corte durante o período de criação.	Quatro grupos de 20 frangos foram colocados em câmaras com ambiente controlado durante 28 dias e sujeitos a concentrações de amoníaco de 0, 50, 100, 200 ppm.	<ul style="list-style-type: none"> • As aves expostas ao amoníaco apresentavam um peso corporal significativamente inferior às aves a 0ppm (reduções superiores a 8%). • As aves expostas ao amoníaco apresentaram menor conversão alimentar.
Wang <i>et al.</i>, 2010	Effect of atmospheric ammonia on growth performance and immunological response of broiler chickens	Determinar o efeito de diferentes níveis de amoníaco sobre o desempenho do crescimento e resposta imunológica em frangos de corte.	480 pintos do dia foram divididos em quatro grupos e colocados em câmaras com ambiente controlado durante 3 semanas. Os grupos encontravam-se sujeitos níveis de amoníaco de 0, 13, 26 e 52 ppm.	<ul style="list-style-type: none"> • Os pintos sujeitos a níveis de 52ppm apresentaram menores massas corporais e de conversão de alimento em produto que os restantes. • Os pintos expostos a 26 e 52 ppm de amoníaco apresentam menor resposta imunológica que os pintos a 0ppm.
Yahav, 2004	Ammonia affects performance and thermoregulation of male broiler chickens	Determinar o efeito da sujeição a diferentes concentrações de amoníaco sobre o desempenho e capacidade de termorregulação em frangos de corte.	192 Frangos de 4 semanas foram divididos em quatro grupos de tratamento durante 3 semanas. Cada um dos grupos estava sujeito a concentrações de 16, 28, 39 e 54ppm de amoníaco.	<ul style="list-style-type: none"> • O peso corporal e o consumo de ração reduziram proporcionalmente com o aumento da concentração de amoníaco. • A eficiência alimentar não diferiu significativamente entre os tratamentos, contudo os frangos expostos a menores concentrações apresentaram a maior eficiência alimentar. • Os frangos expostos a menores concentrações de amoníaco apresentaram melhor capacidade de termorregulação.
Miles <i>et al.</i>, 2004	Atmospheric ammonia is detrimental to the performance of modern commercial broilers	Determinar o efeito de diferentes concentrações de amoníaco sobre o ganho de massa corporal e rendimento em frangos de corte.	60 Pintos do dia foram divididos em grupos e colocados em câmaras com ambiente controlado. Cada um dos grupos estava exposto a concentrações de amoníaco de 0, 25, 50 e 75ppm durante 7 semanas.	<ul style="list-style-type: none"> • A massa corporal final foi reduzida significativamente em 6 e 9%, para concentrações de 50 e 75ppm respectivamente, comparativamente com os frangos expostos a 0ppm. • A taxa de mortalidade foi significativamente maior a 75ppm (13.9%) que a 0ppm (5.8%).

Referência bibliográfica	Título	Objectivos	Descrição do método	Resultados
Olanrewaju et al., 2007	Interactive effects of ammonia and light intensity on ocular, fear and leg health in broiler chickens	Avaliar o efeito interactivo do amoníaco e da intensidade de luz em problemas oculares, stress e problemas nas patas de frangos de carne.	792 Pintos do dia foram divididos em 9 câmaras de ambiente controlado e foram sujeitos a diferentes níveis de amoníaco (0, 25 e 50 ppm) e diferentes intensidades de luz (0.2, 2.0 e 20lx) durante 7 semanas.	<ul style="list-style-type: none"> • Concentrações de 25 e 50 ppm de amoníaco induziram lesões oculares depois do 7º dia de exposição. • A intensidade luminosa só por si não causa danos significativos.
Beker et al., 2004	Atmospheric ammonia concentration effects on broiler growth and performance	Determinar o efeito de diferentes concentrações de amoníaco na performance e em variáveis potencialmente associadas à síndrome de ascite em frangos de corte.	72 Frangos de corte do dia foram divididos em 12 câmaras respiratórias, para uma exposição contínua a 0, 30 e 60 ppm de amoníaco durante 3 semanas.	<ul style="list-style-type: none"> • O peso corporal final e o consumo de ração não foram afectados significativamente com o aumento da concentração do amoníaco de 0 a 60ppm. • A razão entre o consumo de ração e o ganho de peso corporal sofreu uma diminuição significativa comparativamente com a dos pintos sujeitos a 30ppm. • As elevadas concentrações de amoníaco em aviários diminuem a performance dos frangos e aumentam a susceptibilidade a doenças.
Charles e Payne, 1966	Effects on respiration and on the performance of broilers and replacement growing stock	Estudar a influência de altas concentrações de amoníaco na performance de frangos.	Frangos de corte de foram colocados em câmaras de ambiente controlado, divididos por intervalos de idade e sujeitos a várias concentrações de amoníaco (0, 53, 78 e 100 ppm). Posteriormente foram analisados vários parâmetros tais como o pH do sangue, profundidade e intensidade da respiração, ganho de peso, conversão de alimento, consumo de ração, etc.	<ul style="list-style-type: none"> • Os frangos criados em ambientes com 100 ppm de amoníaco apresentaram reduções na taxa de respiração entre 7 e 27%, menor produção de dióxido de carbono e profundidade respiratória. • Frangos de corte criados em ambientes com altas concentrações de amoníaco tendem a comer menos alimento e apresentam menor taxa de crescimento do que frangos de corte criados em ambientes livre de amoníaco.

Referência bibliográfica	Título	Objectivos	Descrição do método	Resultados
Oyetunde et al., 1978	Aerosol Exposure of ammonia, dust and <i>Escherichia coli</i> in broiler chickens	Estudar o efeito do amoníaco, poeira e de <i>E. coli</i> , quer isoladamente ou de forma combinada, no trato respiratório das aves na tentativa de determinar o possível papel destes factores ambientais no desenvolvimento de doenças respiratórias crónicas ou doença saco de ar em frangos de corte.	Sete grupos de tratamento, cada um destes compostos por 12 frangos com 4 semanas de idade, foram expostos no interior de uma câmara de controlo de forma contínua durante 4 semanas a aerossóis de gás amoníaco, poeira e <i>E.coli</i> , de forma isolada e combinada.	<ul style="list-style-type: none"> • A exposição das galinhas ao gás amoníaco causou algum desconforto transitório, resultando na redução do consumo de alimento e perda de peso. • Logo após 12 horas de exposição ao amoníaco sozinho ou em combinação com <i>E. coli</i>, pó ou ambos, foi possível observar lesões macroscópicas e microscópicas nos sacos aéreos. • As reacções mais graves ocorreram quando combinados os três factores em simultâneo. • Após uma semana, os frangos expostos aos três factores desenvolveram lesões granulomatosas nos pulmões.
Kling e Quarles, 1974	Evaluation of Ammonia and Infectious Bronchitis Vaccination Stress on Performance and Carcass Quality	Avaliar a resposta dos frangos de corte à exposição a amoníaco atmosférica e à vacina da bronquite infecciosa.	80 Frangos de corte foram distribuídos de forma aleatória em 12 câmaras de ambiente controlado. Entre as 4 e as 8 semanas de idade foram expostos a concentrações de 0, 25 ou 50 ppm de amoníaco e na quinta semana foi-lhes administrada a vacina da bronquite infecciosa.	<ul style="list-style-type: none"> • Às oito semanas o peso corporal e a eficiência de alimentação de frangos de corte expostas ao amoníaco foram significativamente reduzidos. • Às 6 e 8 semanas de idade foi observada uma situação grave de aerossaculite nos frangos com amoníaco. • Durante o período de oito semanas a concentração de bactérias no ar foram significativamente maiores para 25 e 50 ppm de amoníaco. • A Amoníaco e stress de vacinação da bronquite infecciosa não afectaram o sabor da carne, maciez ou suculência, mas aumentou significativamente a mortalidade e a má qualidade das carcaças.
Anderson et al., 1964	The Adverse Effects of Ammonia on Chickens Including Resistance to Infection with Newcastle Disease Virus	O presente estudo foi feito para determinar os efeitos de exposição prolongada a baixas concentrações de amoníaco sobre aves de capoeira e outros animais.	As observações clínicas, histopatologia e no caso da resistência à infecção por galinhas vírus da doença de Newcastle, foram os critérios utilizados para determinar os efeitos do amoníaco	<ul style="list-style-type: none"> • Uma exposição durante 72 horas de 20 ppm e 48 horas de 50 ppm de amoníaco aumentou significativamente a taxa de infecção das galinhas quando expostas a um aerossol do vírus da doença de Newcastle.

Referência bibliográfica	Título	Objectivos	Descrição do método	Resultados
Al-Mashhadani e Beck, 1985	Effect of atmospheric ammonia on the surface ultrastructure of the lung and trachea of broiler chickens	Examinar a ultra-estrutura da traqueia e da superfície do pulmão em frangos de corte para obter uma compreensão mais precisa das mudanças estruturais devido à exposição a diferentes concentrações de amoníaco atmosférico (NH ₃) durante diferentes períodos de tempo.	Foram realizadas duas experiências utilizando frangos de corte com 7 dias de idade em que quatro aves foram aleatoriamente colocadas em cada uma das quatro câmaras e expostos a 0, 50, 75, ou 100 ppm de NH ₃ . Na primeira experiência, permaneciam durante 7 dias dentro das câmaras e na segunda experiência ficavam apenas 4 dias.	Quando expostas 7 dias a 100 ppm de NH ₃ , os frangos exibiram um grande número de células secretoras de muco que não foram observados nos outros tratamentos. Contudo, não houve evidência da destruição de células caliciformes. <ul style="list-style-type: none"> Na segunda experiência verificou-se uma maior espessura da parede da traqueia nas aves expostas a 75 e 100 ppm do que nas aves de controlo.

2.2. Métodos de redução da formação do amoníaco em aviários

Um dos maiores desafios com que a indústria avícola tem sido confrontada é a volatilização do amoníaco com origem na cama de aviário. Conforme se referiu anteriormente, este fenómeno acarreta problemas graves, não só para o ambiente como também para as aves e para o homem. Deste modo, várias estratégias têm sido propostas e avaliadas de modo a reduzir a emissão e a produção deste gás. Uma das estratégias passa por contrariar os factores ambientais, temperatura, pH e humidade que favorecem a degradação do ácido úrico que representa a principal fonte de azoto excretada pelas aves. Uma outra forma de reduzir a produção de amoníaco é através da redução da ingestão excessiva de compostos azotados. O amoníaco e outros gases azotados resultam da digestão de proteínas, em que parte é convertida em material corpóreo como carne e ovos, sendo a proteína ingerida em excesso perdida no estrume sob a forma de excreções. No caso dos frangos, estes excretam cerca de 55% da proteína que é fornecida nas rações (Jongbloed e Lenis, 1992.), pelo que uma dieta alimentar poderá ser uma boa alternativa para a redução das emissões de amoníaco. As medidas a adoptar para a redução do amoníaco atmosférico em aviários podem, pois, incidir sobre a cama de aviário, quer através da aplicação de aditivos quer pelo controlo das condições ambientais do aviário, ou serem baseadas em processos de manipulação alimentar.

2.2.1. Tratamento do estrume

Na criação de aves, como não é viável a segregação da urina das fezes de modo a reduzir o contacto entre o ácido úrico e a enzima urease, produzida por bactérias urease positivas presentes nas fezes é necessário tratar o estrume de modo a retardar ou inibir a actividade daquela enzima, impedido que ocorra a hidrólise da ureia, retendo os compostos azotados no estrume. Alguns métodos utilizados consistem na aplicação de aditivos que actuam de uma das seguintes formas (Arogo *et al.*, 2001):

- ✓ Absorvem directamente o amoníaco;
- ✓ Reduzem o pH da cama de aviário;
- ✓ Promovem a produção microbiana de ácidos orgânicos que diminuem o pH da cama;
- ✓ Inibem o crescimento microbiano;
- ✓ Inibem a degradação microbiana do ácido úrico.

Existe uma diversa gama de aditivos para cama de aviário, assim como uma grande variedade de estudos que avaliam a sua eficácia. Os agentes acidificantes por exemplo, ao serem aplicados na cama, fornecem iões de hidrogénio que reagindo com o amoníaco formam o amoníaco, que é um composto não volátil, promovendo a redução da emissão daquele gás. Além do fornecimento de iões, a redução do pH cria também condições

desfavoráveis para a actividade da enzima urease, resultando numa menor produção de amoníaco.



A aplicação destes compostos tem como vantagem não só a redução da emissão do amoníaco como também o aumento do valor da cama de aviário enquanto aditivo agrícola, através da fixação de compostos azotados.

Um dos compostos acidificantes que tem sido muito estudado é o sulfato de alumínio. Este composto, depois de promover a formação do amoníaco reage com os iões de sulfato e forma o sulfato de amónia ((NH₄)₂SO₄). Moore *et al.* (1995) observaram uma redução em 99% nas emissões de amoníaco quando sulfato de alumínio foi adicionado à cama. Também Li *et al.* (2006) verificou uma redução de 89% na volatilização de amoníaco quando este composto era adicionado a uma razão de 2kg de sulfato de alumínio líquido por metro quadrado. Num estudo realizado por Do (2005) comprova a capacidade não só do sulfato do alumínio, mas também do cloreto de alumínio, do sulfato ferroso e do permanganato de potássio para reduzir as emissões de amoníaco em 89, 97, 91 e 69% respectivamente, quando adicionados à cama de aviário. Já as combinações de sulfato de alumínio e carbonato de cálcio, cloreto de alumínio e carbonato de cálcio reduziram a emissão de amoníaco em 79, 76%, respectivamente.

A capacidade dos zeólitos para suprimir as emissões de amoníaco em aviários foi investigado por Kithome *et al.* (1999) que observou uma redução de 44% das emissões de NH₃ quando este composto era aplicado em cama de aviário. Li *et al.* (2006) verificou que quando aplicado 5% (w/w) de zeólito em cama de aviário fresca as emissões de amoníaco reduziram em 81%.

Shi *et al.* (2001) investigaram o inibidor de urease n-(n-butil) tiofosfórico triamida como potencial aditivo de estrume para reduzir as emissões em instalações de criação de bovinos. Os resultados demonstraram que quando este inibidor era aplicado em cama de aviário as emissões poderiam ser reduzidas em cerca de 35%.

Contudo, apesar da vasta gama de inibidores, esta solução ainda é considerada economicamente inviável, uma vez que apresenta uma eficácia com duração muito limitada e custos com a aquisição dos químicos elevados (Parkhurst *et al.*, 1974; Veloso *et al.*, 1974; Swenberg *et al.*, 1980).

2.2.2. Manipulação Alimentar

A redução das emissões de amoníaco podem ser facilmente manipuladas através de uma dieta alimentar apropriada. Contudo, o ajuste da composição da ração animal de modo a promover a redução desejada da excreção de compostos azotados, pode comprometer a produtividade, ganho de peso ou conversão alimentar, devendo-se salvaguardar as

necessidades do animal. Um dos métodos utilizados para combater o défice de aminoácidos (principalmente a lisina) sem que seja necessário incrementar a dosagem de proteína bruta, é através da suplementação de aminoácidos sintéticos. Assim, responde-se às necessidades do animal e é reduzida a excreção de azoto (N) (Hobbs *et al.*, 1996). Vários estudos provam que basta uma redução de 1% em proteína bruta na dieta para que se o tenha uma redução de 10% na excreção de azoto em aves de capoeira (Aarnink *et al.*, 1997; Van Cauwenberghe e Burnham., 2001; Van der Peet-Scwering *et al.*, 1997). Segundo Han e Lee (2000) uma redução entre 2 a 4% na proteína pode ser concretizada sem que o ganho de peso ou a conversão alimentar seja influenciada. Um estudo realizado por Blair *et al.* (1999) revela que um ajuste dietético, reduzindo o teor de proteína bruta e suplementando com aminoácidos sintéticos, permitiu a redução da excreção de N entre 10 a 27% na produção de frangos de corte e de 18 a 35% nos pintos e galinhas poedeiras. Além da redução de proteína, ou da adição de aminoácido sintéticos, é também possível adicionar outros suplementos alimentares com capacidade para reduzir as emissões de amoníaco. Um desses suplementos é a saponina de iúca. A *Yucca schidigera* é uma espécie da planta da iúca que é nativa do sudoeste dos Estados Unidos e do México. Esta planta é rica em saponinas esteróides naturais que têm capacidade de reduzir as concentrações de NH_3 em aviários e de aumentar a produção de ovos (Johnston *et al.*, 2012). De acordo com um estudo efectuado por Smith (1980), o uso de 40% de iúca saponina misturada com a ração reduziu os níveis de amoníaco de 118 ppm para 70 ppm. Em contrapartida, Johnston *et al.* (1981) observou que ao fornecer 63 ppm deste suplemento na ração de frangos de corte, apesar destes apresentarem um peso significativamente mais elevado que os frangos de controlo aos 28 e 51 dias de idade, não se verificaram diferenças significativas no que diz respeito aos níveis de amoníaco no aviário.

Também os zeólitos podem ser utilizados como suplementos alimentares. Milic *et al.* (2006) observou uma redução de emissão de amoníaco de 33% quando era adicionado 2% do zeólito clioptilolite na ração de leitões. Outros suplementos alimentares têm sido testados para reduzir a emissão de amoníaco, como são exemplo os metais cobre, magnésio, manganês e o zinco, que além de serem aditivos comuns na alimentação das aves, apresentam forte potencial inibidor sobre a enzima urease, impedindo a produção de amoníaco. Estes metais, apesar de desempenharem um papel importante na alimentação animal quando utilizados de forma adequada, podem tornar-se extremamente nocivos quando utilizados em sobredosagem (Hunde *et al.*, 2012).

2.2.3. Controlo das condições ambientais do aviário

O controlo da humidade e temperatura da cama de aviário é provavelmente a solução mais largamente utilizada pela maioria dos produtores devido à sua simplicidade. Tanto a temperatura como a humidade influenciam a vida e actividade bacteriana no estrume, sendo que esta é favorecida por temperatura e humidade elevadas (Jongbloed e Lenis,

1992). Num estudo realizado por Ferguson *et al.* (1998), confirmou-se a relação entre elevadas percentagens de humidade da cama e o aumento da emissão de amoníaco. Também Coufal e co-autores (2006) verificaram que temperaturas mais elevadas estimulam a actividade microbiana no estrume, potenciando o aumento da degradação enzimática do ácido úrico e proteínas em NH_3 . Segundo Bleizgys *et al.* (2013) a redução de 1°C da temperatura média anual do ar num aviário diminuiu as emissões de amoníaco anuais em cerca de 5%. Quanto aos níveis de humidade na cama, estes devem ser inferiores a 30% de modo a evitar a emissão de grandes quantidades de amoníaco (Patterson e Adrizal, 2005).

Alguns factores que podem ajudar no controlo da humidade e da temperatura são o fornecimento de água através de bebedouros evitando o seu derrame, a utilização de serradura, cascas de arroz e outros matérias absorventes na cama e, principalmente, através de uma ventilação adequada, promovendo a secagem da superfície da cama, regulando a temperatura do ar no edifício e tentando evitar que o fluxo de ar quente sobre directamente na superfície do estrume (Vranken *et al.*, 2003; Patterson e Adrizal, 2005). Apesar do controlo destes parâmetros ajudar a reduzir as emissões de amoníaco, esta abordagem por si só não é suficiente uma vez que além da dificuldade em manter a temperatura e a humidade a níveis que desfavoreçam a actividade microbiana, a manutenção destas condições através de ventiladores/aquecedores implica custos energéticos muito elevados.

Pode-se, pois, concluir que a emissão de amoníaco de camas de aviário continua a ser uma grande preocupação para a indústria avícola. Apesar do vasto leque de técnicas desenvolvidas para minorar a produção e libertação de amoníaco, todas apresentam algumas desvantagens que limitam a sua implementação. Umas são dispendiosas, outras pouco eficazes e outras, ainda podem trazer implicações na saúde/ desenvolvimento/ produção do animal.

Assim, torna-se necessário procurar uma alternativa economicamente viável, eficaz e inócua tanto para o ambiente como para o animal.

O objectivo deste projecto visa averiguar a viabilidade da utilização de uma suspensão biológica como forma de atenuar as emissões de amoníaco, recorrendo, portanto, a uma técnica de biorremediação.

Cap.3- Estudo da libertação de amoníaco na cama de aviário



3. Estudo da libertação de amoníaco na cama de aviário

O sistema experimental utilizado para a determinação do amoníaco volatilizado baseia-se na utilização de uma solução absorvente na qual o amoníaco libertado fica retido, permitindo a sua determinação através da quantificação da concentração de azoto na solução absorvente. Com base nesta técnica foram desenvolvidos três grupos de experiências em que se procurou determinar o amoníaco volatilizado da cama de aviário. No primeiro grupo de experiências promoveu-se, com o auxílio de uma bomba, a circulação de ar no interior do reactor onde se encontrava a cama de aviário. No segundo, o reactor com a cama de aviário encontrava-se completamente fechado e sem circulação de ar. Por fim, no último conjunto de experiências, o amoníaco volatilizado foi quantificado a várias alturas numa coluna aberta com cerca de 3m de altura e 0.1m de diâmetro.

3.1. Procedimento Experimental

De seguida são apresentados os esquemas das instalações em cada um dos três grupos de experiências realizadas.

3.1.1. Estudo da volatilização do amoníaco em reactor com circulação de ar

A montagem experimental utilizada para a determinação do amoníaco libertado pela cama de aviário com circulação de ar consiste em três reactores, cada um deles com um volume de aproximadamente 4L, onde no seu interior foi colocada cama de aviário. Cada um destes reactores encontrava-se ligado a dois kitasatos colocados em série contendo 250mL de uma solução de 5% de ácido sulfúrico, de forma a garantir que todo o amoníaco presente na corrente gasosa ficasse retido nesta solução. Por fim, estas três séries de kitasatos encontravam-se ligadas a um kitasato vazio que, por sua vez, está ligado a uma bomba que promove a aspiração do ar. Na figura 3.1 esquematiza-se a montagem experimental utilizada neste estudo.

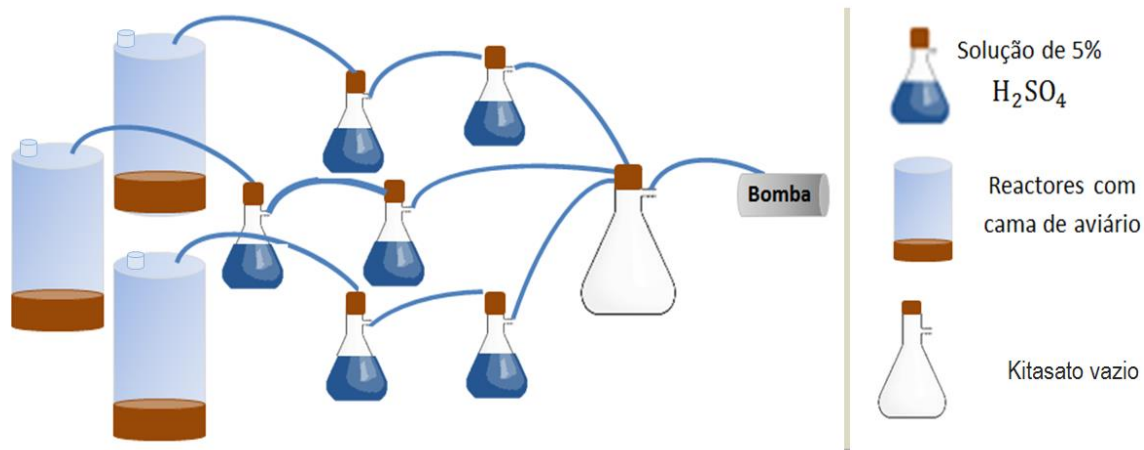
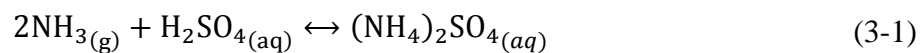


Figura3.1- Esquema representativo da instalação utilizada na determinação do amoníaco volatilizado.

A bomba de vácuo faz com que o ar contendo o amoníaco libertado, proveniente de cada um dos reactores, seja arrastado e borbulhado nas soluções de ácido sulfúrico, onde promove a reacção descrita pela equação que se segue.



Posteriormente, a solução absorvente é analisada para determinação do azoto total. Realizaram-se vários ensaios, seis com uma duração de cerca de 400h e três de cerca de 200h, com recolha de amostras diárias.

De seguida, repetiu-se este mesmo estudo alterando-se a quantidade aplicada da suspensão biológica diluída a 12.8%. Em cada estudo, num dos reactores não se aplicou suspensão, servindo como ensaio de controlo. Nos outros dois reactores aplicaram-se diferentes quantidades da suspensão biológica. Os três reactores encontravam-se à temperatura e humidade atmosférica. Nos primeiros estudos realizados, a aplicação da suspensão era feita com recurso a um conta-gotas. Num dos reactores não era colocada suspensão e nos outros dois reactores estudou-se a influência de diferentes quantidades de suspensão. Realizaram-se três ensaios com uma duração de 200h aproximadamente. Em todos eles um dos reactores não continha suspensão biológica, e os outros dois tinham 5 e 15 gotas, 15 e 30 gotas e por fim 50 e 100 gotas respectivamente. A suspensão era colocada apenas no dia em que se iniciava o ensaio.

Uma vez que o produto preparado se encontra sob a forma de solução aquosa diluída a 12.8% (conforme instruções do fornecedor), a sua aplicação acarreta um aumento da

humidade da cama de aviário. Assim sendo, reformulou-se o estudo anterior tentando manter em todos os reactores a mesma humidade. Para isso, no reactor isento de produto (reactor 1), aplicou-se 25mL de água destilada. No reactor 2, aplicou-se 10mL de suspensão biológica diluída e 15mL de água destilada para assegurar níveis equivalentes de humidade. Por fim, no reactor 3 aplicou-se 25mL de suspensão diluída. Foram feitos três ensaios com duração de 400h aproximadamente e a aplicação da suspensão era repetida 3 vezes por semana (2^a-feira, 4^a-feira e 6^a-feira). A Figura 3.2 esquematiza o método de aplicação de suspensão diluída/água.

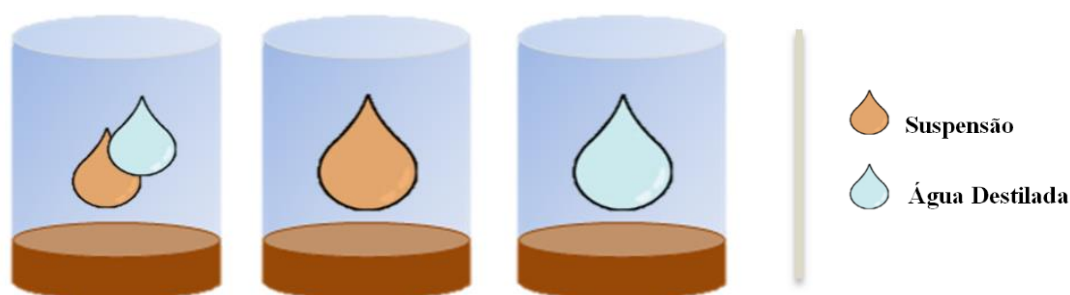


Figura 3.2- Esquema representativo da forma como era aplicada a suspensão biológica diluída, de modo a assegurar que a humidade adicionada a cada reactor ser semelhante.

Para controlar a temperatura do reactor, evitando oscilações diárias, colocaram-se os reactores imersos num banho a 35°C. De modo a garantir a saturação do ar de entrada nos três reactores, fez-se borbular o ar alimentado num matraz contendo água destilada e que também ele se encontrava mergulhado no banho termostatizado. Neste trabalho os kitasato que continham maior volume de solução absorvente foram substituídos por provetas de 500mL de forma a impedir que o volume contido no seu interior fosse transferido para o kitasato de menor volume solução.



Figura 3.3 - Fotografia da instalação laboratorial usada na determinação do amoníaco volatilizado da cama de aviário contido em reactores em banho termostaticado (visão lateral).



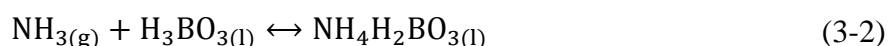
Figura 3.4 - Fotografia da instalação laboratorial usada na determinação do amoníaco volatilizado da cama de aviário contida em reactores em banho termostaticado.

Tal como no estudo anterior, de forma a manter a mesma humidade em todos os reactores, acrescentou-se água, quando necessário, para garantir que os volumes de líquido adicionado à cama de aviário era o mesmo nos três reactores. No primeiro estudo não se colocou produto na primeira semana para analisar a libertação de amoníaco e

posteriormente foi aplicado 3 vezes por semana (2ª-feira, 4ª-feira e 6ª-feira). No estudo seguinte, era aplicado diariamente o produto e a água destilada com recurso a pulverizadores. Neste último ensaio era adicionado também diariamente 100g de cama de aviário para simular a deposição da mesma nos aviários. Para este estudo executaram-se dois ensaios com uma duração de 200h aproximadamente.

3.1.2. Estudo da volatilização do amoníaco em reaktor fechado

Na tentativa de determinar o amoníaco libertado pela cama de aviário recorreu-se a três reactores, cada um deles com um volume de aproximadamente 4L, onde eram colocadas cerca de 100g de cama de aviário (figura 3.5). No seu interior colocava-se também um copo de precipitação de 100mL com 50mL de uma solução absorvente, uma solução de 1% de ácido bórico, por ser a mais utilizada na determinação de amoníaco pelo método de Kjeldhal. Este sistema experimental é baseado num sistema desenvolvido por Hernandez e Cazetta (2001). O amoníaco libertado reage com o ácido bórico segundo a equação que se segue.



Para determinar a libertação de amoníaco ao longo do tempo num período de oito horas, retirava-se uma amostra de 40mL da solução absorvente por hora, que era posteriormente reposta com 40mL de solução absorvente “limpa” (figura 3.6).



Figura 3.5 - Reactor utilizado para determinar o amoníaco volatilizado da cama de aviário, no segundo grupo de experiências.

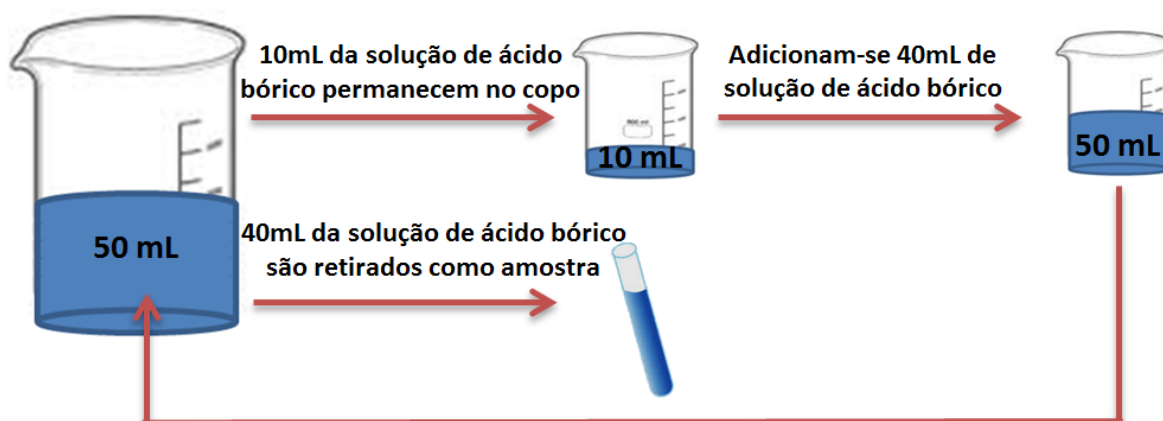


Figura 3.6 - Método de recolha de amostras e reposição de volume de solução absorvente, no segundo grupo de experiências.

Na tentativa de evitar a dissipação do gás amoníaco do interior do reactor para o exterior, as amostras eram retiradas através de uma abertura existente na parte superior da tampa do reactor, com recurso a uma pipeta de 50mL e tentando demorar o mínimo tempo possível. Na figura 3.5 é possível observar a abertura através da qual eram retiradas as amostras (assinalada com a letra A).

Para analisar a influência da concentração de suspensão biológica aplicada, foi determinada a quantidade de amoníaco volatilizado para diferentes concentrações da suspensão biológica. Em cada estudo, num dos reactores não era aplicada suspensão e nos outros dois eram aplicadas soluções contendo diferentes concentrações da suspensão biológica, sendo que um delas tinha sempre o dobro da concentração do outro. Tal como referido anteriormente, para que a humidade nos três reactores se mantivesse constante, o volume total da suspensão foi constante, tendo-se utilizado água destilada para perfazer o volume total adicionado. Os três reactores encontravam-se à temperatura atmosférica. A aplicação da suspensão era feita com recurso a pulverizadores e apenas no dia em que o estudo tinha início. Este ensaio foi repetido três vezes, sendo que no primeiro foi aplicado um volume total de 10mL de água destilada, suspensão biológica a 12.8% ou ambos, no segundo 5mL e por fim 2mL no terceiro.

Num outro estudo, por forma a criar condições climatéricas semelhantes às da unidade de recria e a evitar variações térmicas, colocaram-se os reactores imersos num banho a 25°C. Todo o procedimento era igual ao anteriormente apresentado, continuando a haver um reactor utilizado como referência, ao qual apenas era adicionada água destilada. Tanto a suspensão como a água destilada eram colocadas com recurso a pulverizadores apenas no dia em que se dava início ao estudo. Na figura que se segue apresenta-se o sistema utilizado neste método.



Figura 3.7 - Reactores em banho termostatzado.

Para este método foram feitos três ensaios aplicando sempre o mesmo volume de líquido (2mL de água, suspensão biológica ou ambos) e sob as mesmas condições térmicas (25°C).

3.1.3. Estudo do perfil de volatilização do amoníaco

Para a determinar a concentração do amoníaco em diferentes cotas, utilizou-se uma coluna de acrílico com 3m de altura e 0.1m de diâmetro. Na base da coluna encontrava-se depositada a cama de aviário no interior de um recipiente com diâmetro semelhante ao da coluna e com 0.15m de altura. A utilização deste recipiente tinha como principal objectivo facilitar a substituição da cama de aviário, uma vez que a coluna só tinha a abertura superior, o que dificultava o acesso à zona onde a cama era colocada (figura 3.8). De modo a possibilitar a determinação da concentração do amoníaco ao longo da coluna, distribuíram-se vários *vails* distanciados cerca de 0.5m de altura entre si, suspensos por um fio (Figura 3.8). No interior dos *vails* colocou-se 35mL de uma solução de ácido bórico a 1% com a qual o amoníaco libertado reagia e ficava retido como amonião, sendo possível posteriormente a sua quantificação. As amostras eram recolhidas diariamente durante a primeira semana aproximadamente, sendo sempre registada a hora de substituição e a temperatura atmosférica. Após a primeira semana, devido à reduzida libertação de amoníaco, as amostras eram recolhidas em intervalos de tempo superiores.



Figura 3.8 - Da esquerda para a direita: fotografia frontal da coluna utilizada durante este trabalho; recipiente utilizado para a colocação da cama de aviário e sistema de suspensão dos vials ao longo da coluna.

Este ensaio foi repetido três vezes, sendo que numa experiência foi utilizada cama de aviário fresca sem adição da suspensão JASS, e nas outras duas foi utilizada cama de aviários descongelada, uma com e outra sem adição da suspensão biológica JASS diluída a 12.8%.

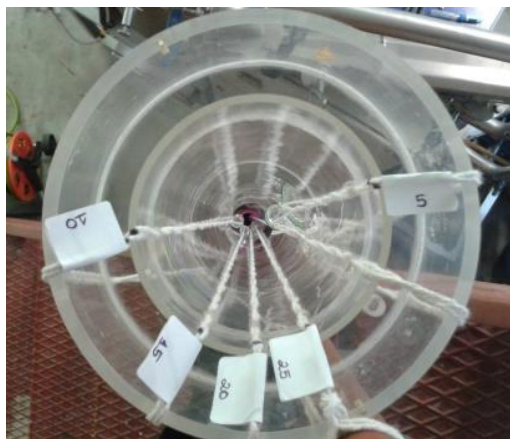


Figura 3.9 - Fotografia da abertura da coluna utilizada neste ensaio laboratorial.

3.2. Materiais e Métodos

Segue-se a listagem do material utilizado para cada um dos trabalhos laboratoriais realizados para a determinação do amoníaco volatilizada das camas de aviário.

Tabela3.1- Material reagentes e equipamentos utilizados na execução dos trabalhos laboratoriais.

Reactor com circulação de ar	Reactor fechado	Coluna
Suspensão biológica Jass, Bio-systems Europe, Lote:1101		
Banho termostatzado Sotel HAAKE E12 220volt		Coluna de acrílico
3 Reactores de acrílico		Recipiente com diâmetro semelhante ao da coluna
3 Provetas de 500mL	3 Copos de precipitação de 50mL	
4 Kitasatos de 500mL		
1 Erlenmeyer de 1L		
8 Rolhas de cortiça		
1 Bomba de vácuo Reagent5, Química e electrónica Lda. 0.08kW, 230volt	Ácido bórico (99.8%, lote:9636319, Merck)	
Ácido sulfúrico (95%, lote: 1362941, val.: 11/2019, Fisher Chemical)		

A determinação da quantidade de amoníaco absorvida na solução ácida foi realizada com recurso à determinação do azoto total no aparelho TOC/TN da Shimadzu, que combina uma unidade TNM-1 para análise do TN pelo método de quimiluminescência, com um analisador TOC-VCPH para análise do TOC pelo método de oxidação por combustão catalítica com detecção NDIR (detecção não-dispersiva com infravermelho) (Figura 3.10). Assim, para efectuar a quantificação do amoníaco numa amostra, a amostra é introduzida no tubo de combustão, onde o azoto presente na amostra é decomposto em monóxido de azoto. Posteriormente, o gás de transporte arrasta o monóxido de azoto, que depois de arrefecido e desumidificado entra num analisador de gases por quimiluminescência, onde o monóxido de azoto é detectado e quantificado (Shimadzu, 2001)



Figura 3.10- Fotografia do aparelho de medição do azoto total TOC/TN da Shimadzu.

3.3. Resultados e discussão

Após a análise das amostras retiradas em cada um dos estudos obtiveram-se os resultados cujo tratamento é apresentado de seguida.

3.3.1. Estudo da volatilização do amoníaco em reactor com circulação de ar

Após a realização deste trabalho e da observação dos resultados obtidos, verificou-se que o mesmo apresentava algumas falhas que tornavam o método pouco eficaz. Uma dessas falhas passava por ser difícil garantir que as condições de circulação de ar, nomeadamente de caudal, eram iguais para os três reactores, além do que se detectou a existência de algumas fugas muito difíceis de controlar. Outro obstáculo verificado residiu no facto da

cama de aviário ser uma matéria heterogénea, composta não só pelos dejectos das aves, mas também por restos de ração, penas, serradura, entre outros. Por muitos esforços que fossem feitos, era difícil garantir a homogeneidade das misturas iniciais e, consequentemente, que os três reactores apresentavam as mesmas quantidades de compostos azotados na sua composição. As várias limitações observadas neste grupo de experiências conduziram a resultados muito instáveis e, portanto, inconclusivos, pelo que se optou por apresentar apenas em anexo (anexo I.1)

3.3.2. Estudo da volatilização do amoníaco em reactor fechado

Para a determinação da quantidade de amoníaco absorvida pelas soluções de ácido bórico em cada uma das amostras recolhidas efectuaram-se cálculos que se descrevem na tabela seguinte:

Tabela 3.2 - Cálculos efectuados para a determinação da quantidade de amoníaco absorvida pelas soluções de ácido bórico nas amostras recolhidas.

n	TN	m_A	m_{abs}
1	TN_1	$m_A^1 = TN_1 \times V_1 \times \frac{m_{NH_3}}{m_N}$	$m_{abs}^1 = m_A^1$
2	TN_2	$m_A^2 = TN_2 \times V_2 \times \frac{m_{NH_3}}{m_N}$	$m_{abs}^2 = m_A^2 - m_A^1 \times \frac{10}{50}$
3	TN_3	$m_A^3 = TN_3 \times V_3 \times \frac{m_{NH_3}}{m_N}$	$m_{abs}^3 = m_A^3 - m_A^2 \times \frac{10}{50}$
n, n>1	TN_n	$m_A^n = TN_{n+1} \times V_n \times \frac{m_{NH_3}}{m_N}$	$m_{abs}^n = m_A^n - m_A^{n-1} \times \frac{10}{50}$

Em que TN representa a concentração de azoto total na amostra retirada do copo existente no reactor, determinada no aparelho TOC/TN e expressa em $\frac{mg_N}{L}$, m_A representa a correspondente massa de amoníaco que existiria na amostra, expressa em mg_{NH_3} , m_{abs} corresponde à massa de amoníaco absorvido no período de amostragem, expresso em mg_{NH_3} , V representa o volume total da solução de ácido bórico presente no interior do reactor em mL.

De seguida apresentam-se alguns dos resultados obtidos dos ensaios realizados com os reactores fechados e monitorização passiva do amoníaco libertado, em que se representa a amoníaco libertada ao longo do tempo para cada um dos reactores. Os restantes resultados obtidos nesta experiência apresentam-se no anexo I.2, uma vez que, uma vez mais, as limitações do método não permitiram obter resultados conclusivos.

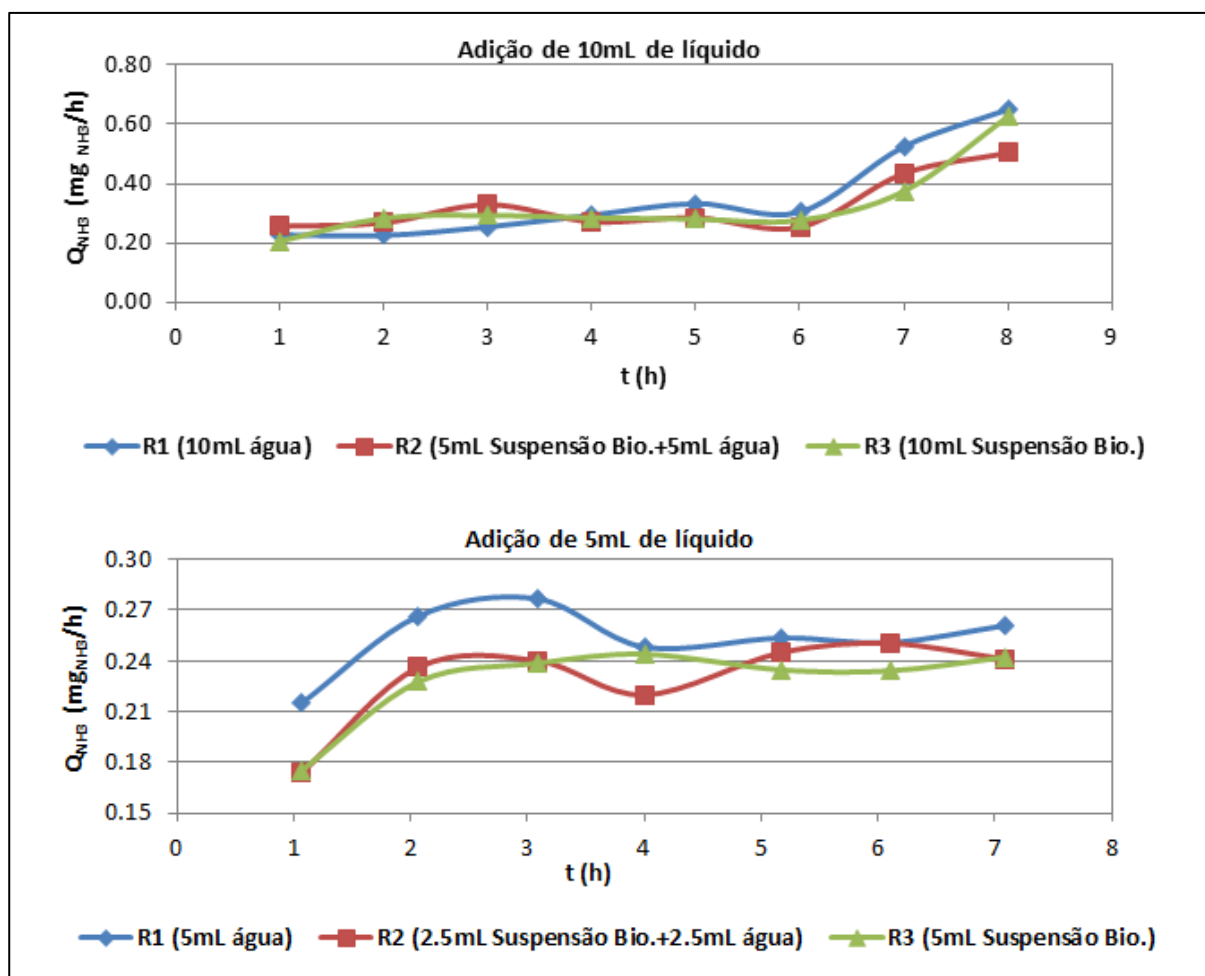


Gráfico 3.1- Caudal mássico de amoníaco libertado ao longo do tempo nos ensaios realizados com os reactores fechados contendo cama de aviário sem aplicação da suspensão biológica (R1), com aplicação de suspensão biológica e água (R2) e com aplicação apenas da suspensão biológica (R3).

Como se pode ver através dos gráficos anteriormente apresentados, o caudal de amoníaco libertada apresenta comportamento distinto nas duas experiências. No primeiro trabalho, ou seja, quando foram administrados 10mL de líquido, os três reactores apresentaram um padrão de volatilização de amoníaco muito semelhante. Nas primeiras três horas, aproximadamente, o reactor onde se adicionou apenas água foi o que apresentou a menor quantidade de amoníaco libertada. A partir das 4h iniciais, esse reactor passa a ser o que apresenta uma maior libertação de amoníaco. Já no segundo trabalho, com 5mL de líquido, embora os três reactores apresentem caudais de volatilização de amoníaco muito próxima, o reactor em que apenas se colocou água apresenta valores ligeiramente mais elevados, sendo esta diferença mais visível principalmente nas 3h iniciais. Em ambos os ensaios, os reactores onde foi colocada suspensão biológica e suspensão biológica com água apresentam comportamentos muito semelhantes.

Para uma melhor compreensão dos resultados obtidos, apresenta-se de seguida a representação gráfica da massa de amoníaco libertada ao longo do tempo para cada um dos ensaios.

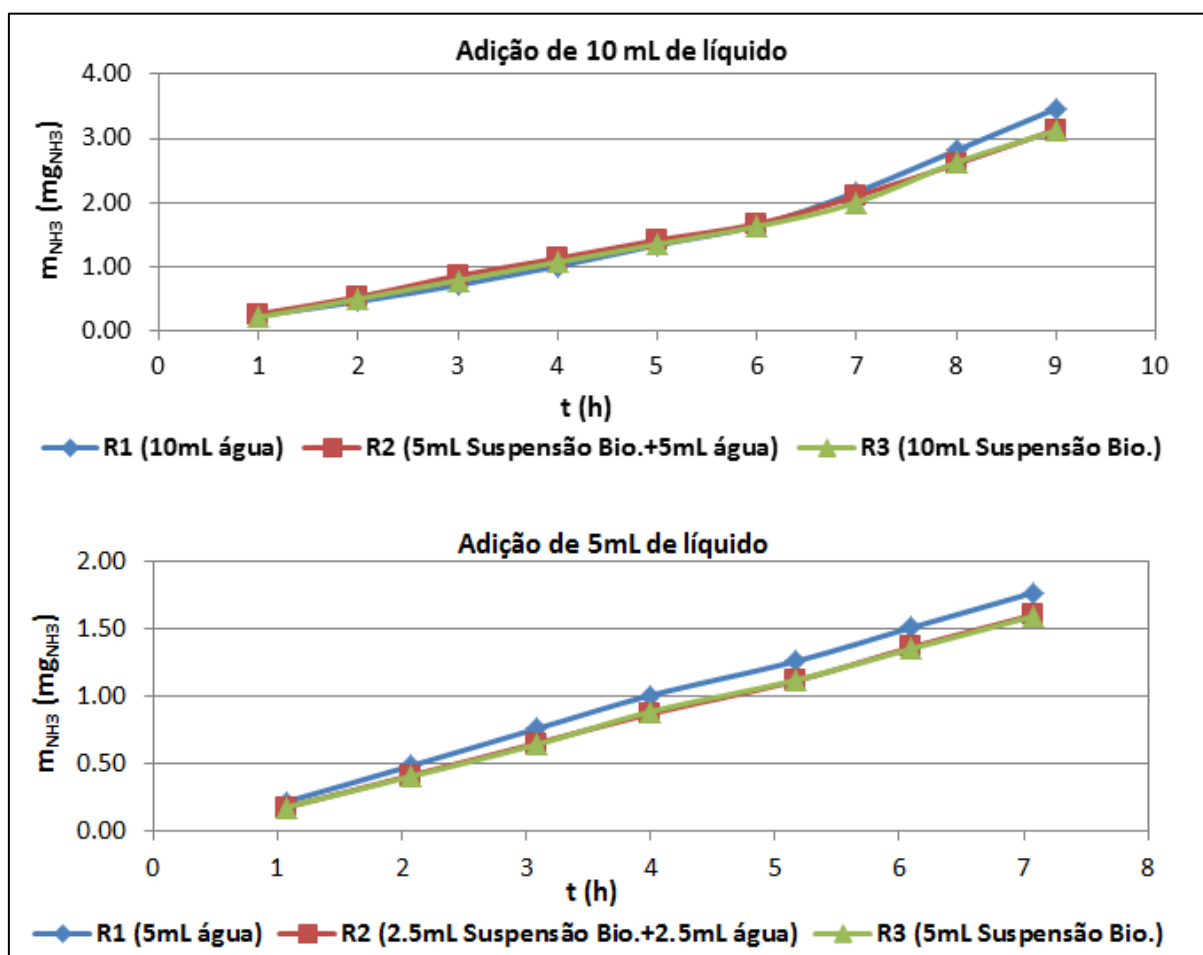


Gráfico 3.2 - Massa de amoníaco libertada ao longo do tempo nos ensaios realizados com os reactores fechados contendo cama de aviário sem aplicação da suspensão biológica (R1), com aplicação de suspensão biológica e água (R2) e com aplicação apenas da suspensão biológica (R3).

Como se pode verificar da análise dos gráficos anteriormente apresentados, a massa de amoníaco libertada em cada um dos três reactores apresentou resultados distintos. No primeiro ensaio os três reactores apresentam um regime de emissão de amoníaco muito semelhante, sendo que apenas a partir das 7h de experiência o reactor isento da suspensão biológica em estudo apresenta uma maior massa de amoníaco volatilizado. Já no segundo ensaio os reactores que continham suspensão biológica apresentaram durante todo o processo menores quantidades de amoníaco volatilizado do que o reactor isento de suspensão.

Com o intuito de estudar a volatilização do amoníaco num ambiente termicamente semelhante ao da recria, evitando-se as variações térmicas, realizaram-se três ensaios com os reactores imersos num banho a 25°C. Ao reactor 1 foram aplicados 2mL de água, no 2, 1mL de suspensão biológica e 1mL de água e, finalmente, no reactor 3, 2mL de suspensão.

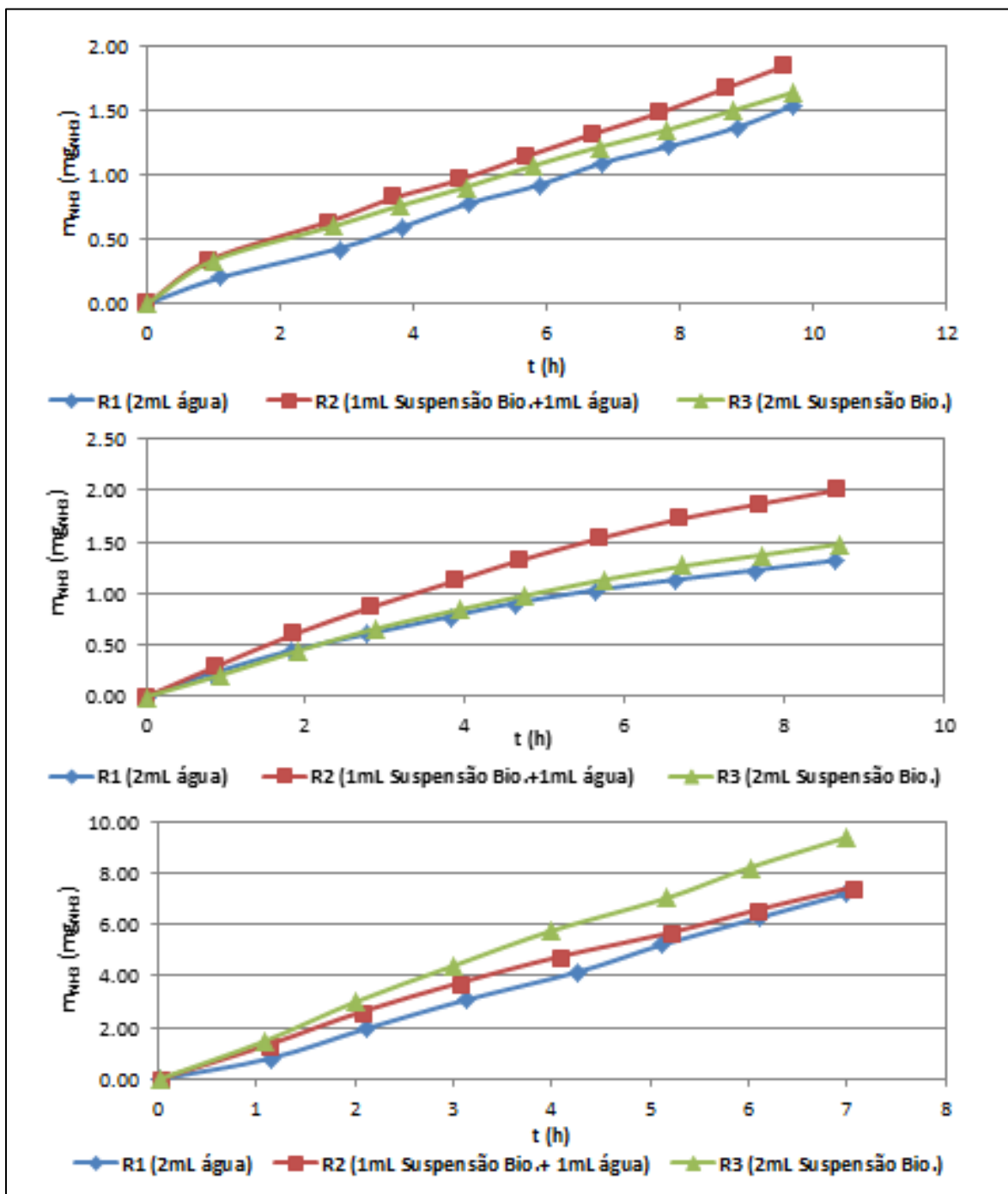


Gráfico 3.3 - Massa de amoníaco libertado ao longo da experiência, nos ensaios realizados a 25°C com os reactores fechados contendo cama de aviário com aplicação de água (R1), suspensão biológica e água (R2) e apenas suspensão biológica (R3).

No primeiro ensaio o reactor 3, ou seja, o que contém maior quantidade de inibidor é o que apresenta maior quantidade de amoníaco volatilizada. Segue-se o reactor que contém 1mL de inibidor e igual quantidade de água e por fim o reactor 1 que apesar de não conter inibidor é o aquele em que são libertadas menores quantidades de amoníaco.

No segundo ensaio verifica-se que uma vez mais o reactor 1, onde apenas foi colocada água é o que apresenta menores valores de emissão de amoníaco, seguindo-se do reactor com maior quantidade de suspensão JASS e por fim o reactor com 1mL de água e 1mL de suspensão.

Por fim, no último ensaio o reactor com 1mL de água e 1mL de suspensão. Destaca-se com uma quantidade de amoníaco volatilizada significativamente superior à dos outros dois reactores. Já o reactor apenas com água, apesar de apresentar valores de emissão muito próximos de reactor com suspensão biológica, continua a ser o que apresenta menores valores de amoníaco libertada.

Assim, da observação dos gráficos acima apresentados, constata-se que a suspensão biológica não aparenta ser eficiente, uma vez que em todos eles o reactor que apresentou menores quantidade de amoníaco volatilizado foi o reactor onde apenas foi aplicada água.

Contudo, como não é possível garantir que os três reactores apresentam camas de aviários com iguais quantidades de compostos azotados na sua composição, não é possível relacionar os menores caudais de libertação de amoníaco com a presença ou ausência da suspensão biológica, mostrando-se o estudo, uma vez mais, inconclusivo.

Com base nestes dois grupos de experiências ode concluir-se que seria necessário realizar novas experiências em que o problema da falta de homogeneidade das camas de aviários pudesse ser ultrapassado para garantir que os três reactores se encontram em condições iguais.

3.3.3. Estudo do perfil de volatilização do amoníaco

Para estudar melhor o perfil de libertação de amoníaco realizou-se um estudo em que se determinou a quantidade de amoníaco absorvido em soluções ácidas colocadas a diversas alturas.

Para descrever a difusão do amoníaco libertado pela cama de aviário ao longo da coluna utilizada na experiência e assumindo que, por se tratar de um processo muito lento, se pode considerar estado pseudo estacionário, pode-se recorrer à primeira Lei de Fick que descreve o processo de difusão em estado estacionário e que correlaciona o fluxo de difusão J_A com o gradiente de concentração $\frac{dC_A}{dx}$. De acordo com a Lei de Fick, a massa de uma determinada espécie que se difunde através de uma dada secção, por unidade de tempo, é proporcional ao gradiente de concentração existente segundo a mesma direcção. A Lei de Fick, para fluxo unidimensional, traduz-se pela equação que se segue:

$$J_A = -D_{AB} \frac{dC_A}{dx}. \quad (3-3)$$

Em que J_A representa o fluxo de difusão da espécie A em $\text{kg/m}^2\text{s}$, D_{AB} é o coeficiente de difusão expresso em m^2/s e, por fim, dC_A/dx é o gradiente de concentração (em que a concentração está expressa em kg/m^3 e a distância em m). O sinal negativo indica que a direção de difusão é contrária ao gradiente.

Integrando a equação anterior entre a base da coluna, $x = 0$, em que a concentração da espécie que se difunde, $C_A = C_{A0}$ e a cota L, $x=L$, em que $C_A = C_{AL}$, obtém-se a seguinte equação:

$$J_A = -D_{AB} \frac{C_{A0} - C_{AL}}{L} \quad (3-4)$$

Que pressupõe, como se referiu anteriormente, a existência de estado estacionário, e consequentemente o perfil de concentração não depende do tempo e o fluxo, J_A não varia nem com o tempo nem com a posição;

Caso fosse possível determinar a concentração de amoníaco a diferentes cotas, teria sido viável determinar o coeficiente de difusão do amoníaco na coluna de ar estagnado, o que não foi efectuado, pois apenas se determinou a massa de amoníaco absorvido em *vials* a diferentes cotas na coluna. De referir que o método utilizado ao remover parte do amoníaco libertado nas diferentes cotas em que se colocou os *vials*, alterou o fluxo de amoníaco na coluna, pelo que este deixou de ser constante em toda a coluna, mesmo quando admitido o estado pseudo estacionário, situação que se representa na figura seguinte.

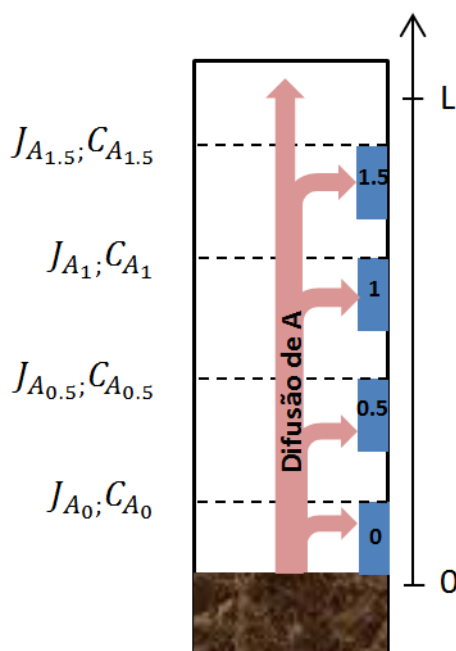


Figura 3.11- Esquema representativo do processo de difusão do amoníaco ao longo da coluna.

Como se ilustra no esquema anteriormente apresentado, o amoníaco ao ser libertada difunde-se ao longo da coluna, ficando parcialmente retido na solução de ácido bórico que se encontrava nos *vials* colocados a diferentes cotas da coluna. Assim, a partir do sistema desenvolvido é possível apenas determinar o fluxo de amoníaco em cada uma das cotas e através da soma delas, determinar o fluxo total médio no período de amostragem. Para a determinação do fluxo de amoníaco, procedeu-se, então, ao seguinte cálculo:

$$J_A = \frac{m_A}{\pi/4D^2\Delta t} \quad (3-5)$$

Onde m_A é a massa de amoníaco, $\pi/4D^2$ a área da secção recta da coluna e Δt o intervalo de tempo de amostragem.

São apresentados de seguida os resultados referentes aos ensaios de determinação do fluxo de amoníaco médio calculado a diferentes cotas da coluna. Nos gráficos encontram-se representados os fluxos totais para cada uma das diferentes cotas (L) ao longo da experiência.

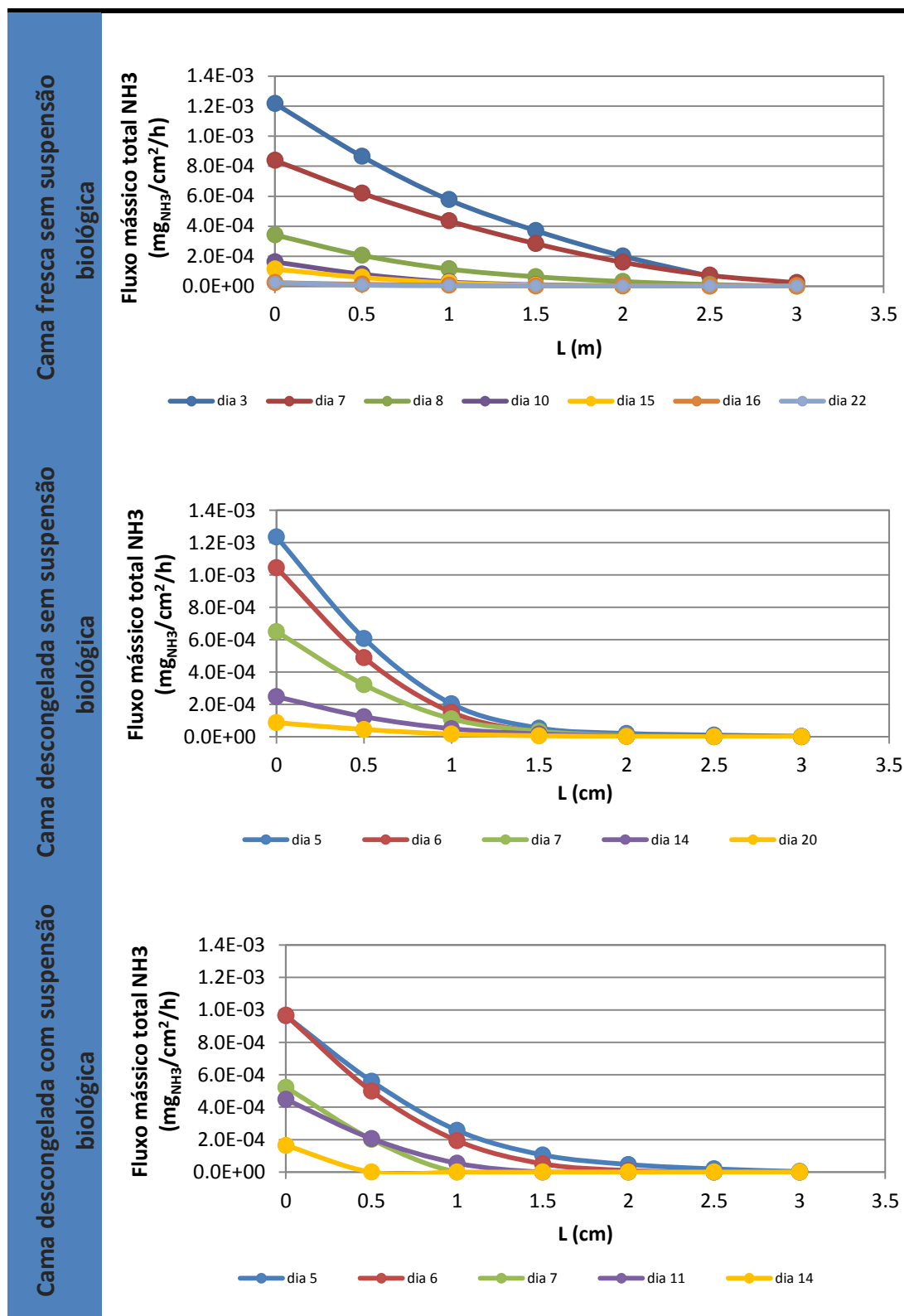


Gráfico 3.4 - Fluxo total de amoníaco difundido (em cama fresca sem produto, descongelada sem produto e descongelada com produto) a diferentes cotas de uma coluna.

Como se pode observar nos gráficos anteriormente apresentados, à medida que nos afastamos da cama de aviário e nos aproximamos da abertura da coluna a concentração de amoníaco diminui. Verifica-se também que à medida que o tempo passa, como o amoníaco vai sendo libertado gradualmente, o seu fluxo vai diminuindo. Comparando os resultados referentes à cama de aviário sem suspensão biológica, o estudo realizado com cama fresca apresenta concentrações mais elevadas ao longo da coluna do que o realizado com cama descongelada, sendo que nesta última as concentrações a partir do *vial* que se encontrava a 1m da cama já apresentam valores nulos. Este resultado deve-se certamente ao facto da colocação de cama parcialmente congelada na coluna tornar o processo de libertação de amoníaco mais lento, conforme era expectável. Relativamente aos resultados do estudo em que se utilizou a cama de aviário descongelada com características semelhantes, pode-se observar que na experiência em que se aplicou suspensão biológica, o fluxo de amoníaco atinge valores inferiores ao estudo em que a suspensão não foi aplicada, o que parece indiciar alguma eficácia do produto na inibição da libertação de amoníaco.

A partir dos valores de fluxo mássico calculados para cada uma das cotas, foi possível determinar o fluxo mássico total libertado à cota zero em cada um dos ensaios realizados, cuja comparação pode ser observada no gráfico que se segue.

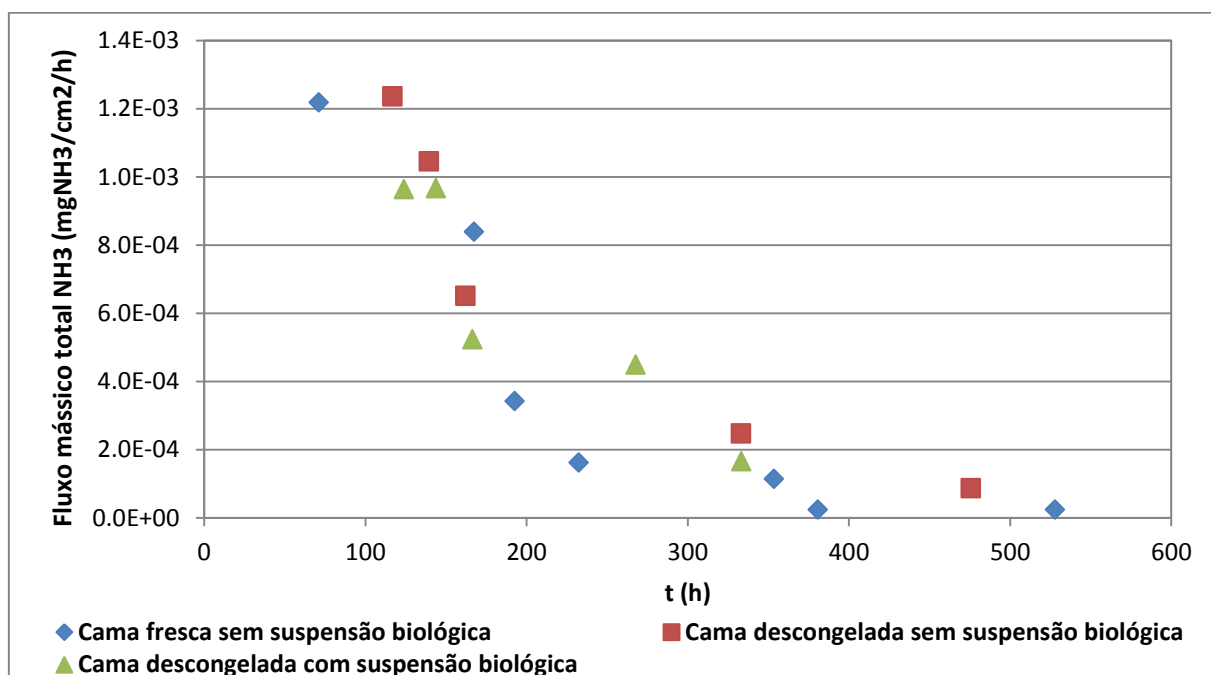


Gráfico 3.5- Evolução do fluxo mássico total à cota 0m de amoníaco ao longo do tempo para cada um dos ensaios realizados.

A partir dos resultados obtidos constata-se que no início do processo de libertação do amoníaco o fluxo mássico apresenta valores superiores, sendo que com o passar do tempo

este fluxo vai diminuindo. Nas experiências em que se usou cama de aviário semelhante (descongelada) pode observar-se que a massa de amoníaco libertada é inferior à que se observou quando se usou o produto em estudo: 16,24mg de NH_3 comparativamente com 18,66mg de NH_3 em 14 dias na experiência sem produto, o que se traduz na inibição de emissão de 13%, o que pode indiciar que o produto consegue efectivamente reduzir a formação e libertação do amoníaco na cama de aviário.

Cap.4- Ensaaios na recria da Ovopor



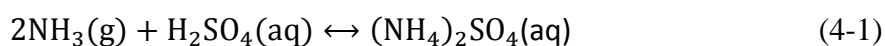
4. Ensaio na recria da Ovopor

Para além dos estudos em laboratório, foi também analisada a eficiência da suspensão biológica JASS em escala real na unidade de recria da Ovopor. Para o efeito realizaram-se duas campanhas de monitorização da concentração de amoníaco no pavilhão de recria, sendo que apenas na segunda campanha foi adicionada a suspensão em estudo. Durante os períodos em que as campanhas decorreram, foram monitorizados além da concentração de amoníaco, o peso e a mortalidade das aves. Os métodos utilizados, bem como os resultados obtidos encontram-se apresentados de seguida.

4.1. Procedimento experimental

Foram controlados os níveis de amoníaco volatilizado durante dois ciclos de criação de pintos. O primeiro ensaio à escala real decorreu no período de Fevereiro-Junho de 2013 com o objectivo de verificar o padrão de libertação do amoníaco em condições normais, sem qualquer tipo de inibição da produção deste gás. No segundo ensaio, que ocorreu entre Março e Julho de 2014, utilizou-se a suspensão biológica diluída a 12.8% como inibidor de produção de amoníaco. Esta suspensão foi aplicada no dia anterior à recepção dos pintos e posteriormente na 3ª, 6ª, 9ª e 12ª semana de criação.

Para a monitorização dos níveis de amoníaco libertados foi medida diariamente a concentração de amoníaco atmosférico. Para isso, adoptou-se um sistema em que um volume conhecido de ar atmosférico foi bombeado e feito borbulhar numa solução de ácido sulfúrico a 1%. Esta solução, que era utilizada para reter o amoníaco, encontrava-se em dois kitsatos em série por forma a garantir que todo o amoníaco ficasse retido na solução. O primeiro que se encontrava mais próximo do ponto de recolha, continha 250mL de solução ácida. O segundo kitsato continha 100mL daquela solução, e funcionava como controlo do funcionamento do primeiro. Ao fazer com que este ar, enriquecido em amoníaco, borbulhasse nas soluções de ácido sulfúrico, promovia-se a reacção que se segue.



As soluções eram recolhidas e substituídas diariamente e posteriormente eram analisadas em termos de azoto total no aparelho TOC/TN da Shimadzu descrito anteriormente (capítulo 3.2). Através do conhecimento da concentração de azoto na solução absorvente, do volume de solução e do volume de ar amostrado pode determinar-se a concentração de amoníaco atmosférico. Para uma melhor compreensão do sistema de

captura do amoníaco volatilizado, encontra-se apresentado de seguida um esquema representativo do mesmo.

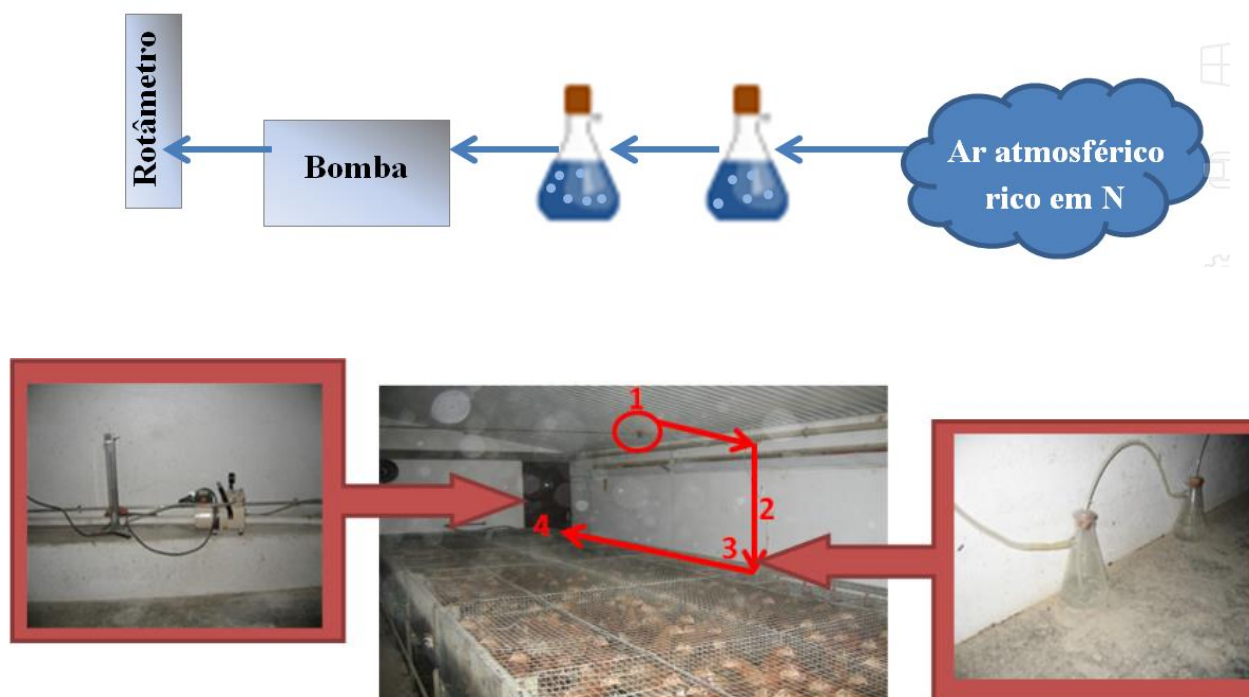


Figura 4.1 - Esquema representativo e imagens do sistema de análise da concentração de amoníaco no pavilhão. 1- Local de amostragem do ar; 2- Percurso do ar desde o ponto de colheita até ao sistema de absorção; 3- Percurso do ar isento de amoníaco desde o sistema de absorção até à bomba de ar.

De forma a procurar averiguar se a volatilização de maiores quantidades de amoníaco estaria associada a uma maior taxa de mortalidade e/ou a um menor rendimento do crescimento dos pintos recolheram-se dados da mortalidade e do ganho de peso dos pintos, ambos fornecidos pela Ovopor. Pretendia-se averiguar se seria possível posteriormente confirmar se uma menor concentração atmosférica de amoníaco estará associada a uma melhor performance da produção avícola.

4.2. Materiais e métodos

De seguida é apresentado na tabela o material e reagentes utilizados para a recolha e análise das amostras para a determinação da concentração de amoníaco no pavilhão de recria.

Tabela 4.1- Material, reagentes e equipamentos utilizados para a determinação da concentração de amoníaco na unidade de recria.

Material diverso
Rotâmetro da ROTA Apparate- und Maschinenbau
2 Kitasatos de 500mL e 250mL
2 Rolhas de cortiça
1 Bomba de vácuo Reagent5, Química e electrónica Lda. 0.08kW, 230volt
Suspensão biológica Jass, Bio-systems Europe, Lote:1101
Ácido sulfúrico (95%, lote: 1362941, val.: 11/2019, Fisher Chemical)

Para a quantificação do azoto total das amostras recolhidas utilizou-se o aparelho de determinação de azoto e carbono total da Shimadzu descrito no capítulo 3.2.

4.3. Resultados e discussão

O gráfico que se segue representa os dados da taxa de mortalidade de diferentes recrias efectuados na Ovopor - Agro-Pecuária dos Milagres, S.A., incluindo as duas que permitiram o presente estudo (Fev. 2013 e Mar. 2014)

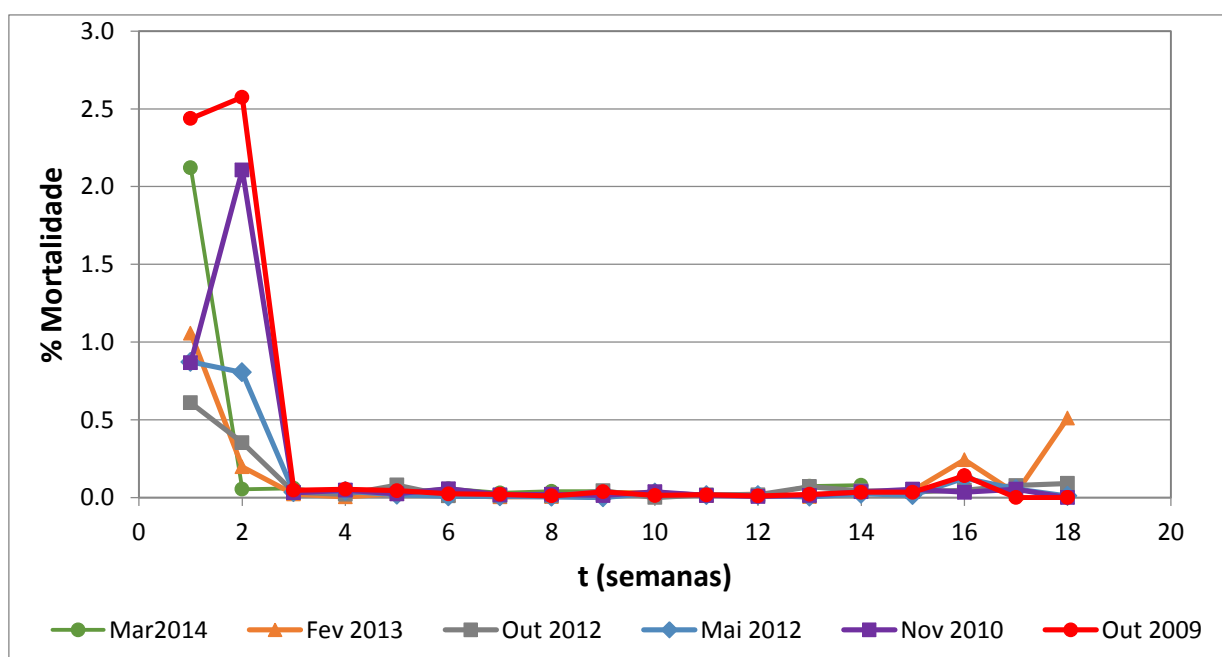


Gráfico 4.1- Taxa de mortalidade das aves nas diferentes semanas de recria.

Como se pode verificar através dos dados representados, as duas primeiras semanas, que correspondem às duas semanas mais críticas da vida das aves, são as que apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada. A elevada mortalidade pode ser justificada pelas exigentes necessidades térmicas das aves nas primeiras semanas de vida, uma vez que, tal como foi anteriormente referido (capítulo 1.4), principalmente na 1ª semana de vida, os pintos ainda não têm desenvolvido o sistema de termorregulação. Quando não se consegue alcançar a zona de conforto térmico das aves, muitas delas acabam por perecer. Contudo, e como se pode ver através dos dados apresentado, a partir da 2ª semana e até à 15ª, a mortalidade mantém-se aproximadamente nula. Apenas a partir da 15ª a mortalidade volta a aumentar, devido às grandes dimensões dos pintos, que conduzem a uma significativa redução do espaço disponível nas gaiolas. As campanhas de Novembro de 2010, Outubro de 2009 e Março de 2014 destacam-se pelas elevadas taxas de mortalidade (superiores a 2%) nos dois primeiros dias. Quanto à recria de Março de 2014, cujos dados foram utilizados neste projecto para apurar a eficiência da suspensão biológica JASS, a elevada taxa de mortalidade deveu-se a uma complicação na utilização de um sistema de laser inovador para o corte do bico dos pintos. Uma falha neste mesmo aparelho levou a um corte do bico excessivo o que fez com que os pintos não conseguissem beber água, o que resultou na morte de 604 pintos na segunda semana por motivos de desidratação

De seguida são apresentados os valores do peso dos pintos ao longo do período de criação de pintos das várias campanhas. Estes dados são adquiridos seleccionando uma pequena amostra de forma alternada. Por se tratar de uma amostra muito pequena poder-se-á questionar a representatividade da amostra relativamente ao bando da campanha em causa.

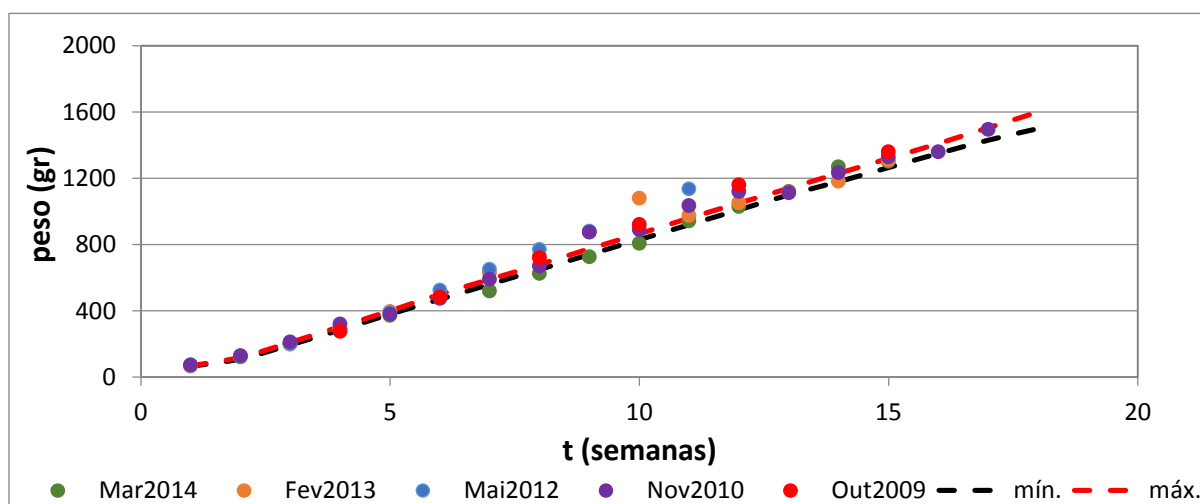


Gráfico 4.2- Evolução do ganho de peso dos pintos ao longo do tempo em diferentes recrias, bem como dos valores mínimos e máximos aconselhados pela veterinária da Ovopor.

Durante o período das 6 a 12 semanas o peso dos pintos das várias recrias varia um pouco, sendo a amplitude de pesos relativamente maior. Com excepção da recria de Março de 2014, durante este período os pintos tendem a ter um peso superior ao máximo padronizado. A possível explicação para o bando em criação de Março de 2014 apresentar o peso abaixo do mínimo padronizado passa possivelmente pela falha no corte dos bicos já referida anteriormente, o que levou não só à diminuição da ingestão de água, mas também de ração.

No gráfico seguinte apresentam-se os resultados da monitorização de cerca de 4 meses em cada campanha estudada da concentração de amoníaco no aviário.

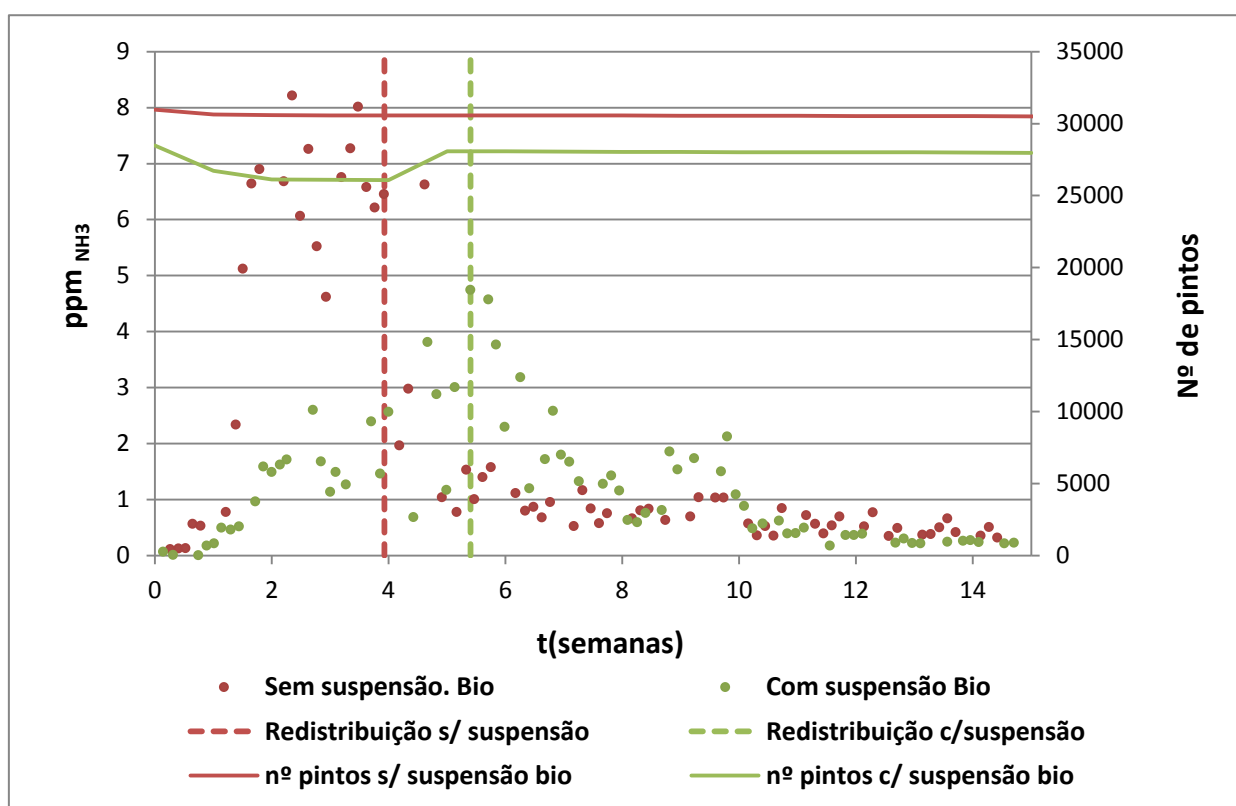


Gráfico 4.3 – Evolução da concentração de amoníaco no edifício de recria e da quantidade de pintos, em cada uma das campanhas, com indicação dos momentos em que foi feita a redistribuição dos pintos pelo pavilhão de recria

Em ambos os períodos de criação verificou-se inicialmente um aumento na concentração de amoníaco que decorre da acumulação de excrementos das aves e do aumento da actividade microbiológica na cama de aviário. Após as primeiras 5/6 semanas aproximadamente, ocorreu um decréscimo na libertação de amoníaco causado pela redistribuição dos pintos pelas gaiolas, sendo que deste modo toda a área do edifício passou a estar ocupada. Esta nova disposição dos pintos fez com que a libertação e a acumulação de

excrementos ocorressem numa maior área, o que consequentemente resultou numa diminuição da concentração de amoníaco atmosférica na zona de colheita. Assim, a partir deste momento e até ao fim da criação os níveis de amoníaco no ar mantiveram-se aproximadamente constantes, uma vez que, a maior proximidade entre a temperatura exterior e interior do pavilhão e o estágio mais avançado de desenvolvimento dos pintos permitiram o aumento da taxa de ventilação e a diminuição da temperatura no interior do edifício. Do gráfico observa-se ainda que a concentração de amoníaco de uma forma geral foi sempre inferior na campanha em que se utilizou o produto em estudo, o que indicia uma clara eficiência de inibição da libertação de amoníaco da cama de aviário. É, ainda, de referir que o valor mais elevado de concentração de amoníaco observado foi de 8,2 e 4,8 ppm na 1ª e 2ª campanhas, respectivamente, claramente abaixo do valor máximo admissível previsto na legislação nacional que é de 20ppm (Decreto-Lei 79/2010 de 25 de Junho), mas acima do limiar de detecção olfactivo (5ppm). Este facto atesta que o sistema de ventilação da Ovopor é eficaz no controlo das condições ambientais do pavilhão de recria.

Um factor que influencia a concentração do amoníaco no pavilhão é, obviamente, o número aves, que foi distinto nas duas campanhas. Na segunda, face ao elevado índice de mortalidade observado, houve necessidade de reintroduzir pintos na 5ª semana. De forma a fazer a eliminar as variáveis ventilação e número de pintos é apresentado de seguida um gráfico com a evolução da concentração de amoníaco *per capita*. Uma vez que nas 4 primeiras semanas de recria o pavilhão se encontra encerrado, sem ventilação artificial e com as janelas fechadas de forma a manter a temperatura elevada, é possível fazer uma avaliação mais rigorosa da eficiência da suspensão JASS neste período, uma vez que as condições de ambas as campanhas são muito semelhantes.

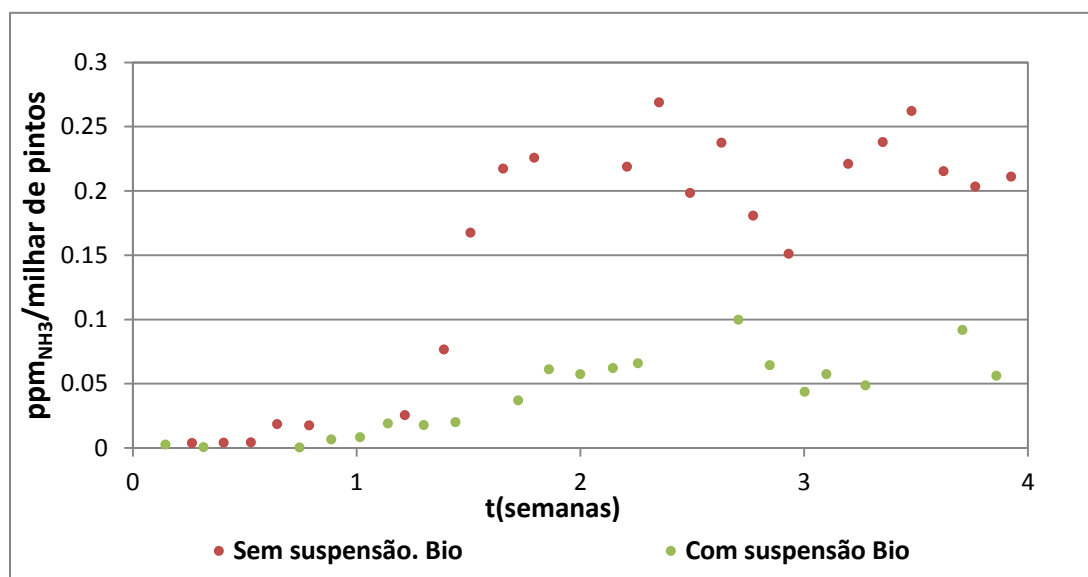


Gráfico 4.4 – Razão entre a concentração de amoníaco volatilizada em partes por milhão e o nº de pintos em milhares de pintos nas duas campanhas.

Como se pode constatar do gráfico apresentado, inicialmente as duas recrias apresentam concentrações de amoníaco volatilizado muito próximas. Contudo, a partir da primeira semana, a recria em que foi aplicada a suspensão JASS apresenta valores de concentração de amoníaco volatilizado claramente inferiores, o que atesta do benefício que pode decorrer para a criação avícola da utilização do produto em estudo. Efectivamente a utilização do produto ao inibir a volatilização do amoníaco permitirá reduzir a necessidade de ventilação e, conseqüentemente, de aquecimento, com vantagens ambientais e energéticas óbvias.

Cap.5- Caracterização da suspensão biológica inibidora da liberação de amoníaco em estudo



5. Caracterização da suspensão biológica inibidora da libertação de amoníaco em estudo

Após estudar em laboratório a libertação do amoníaco de camas de aviário nas quais foi aplicada a suspensão em análise no presente trabalho, verificou-se que a mesma não suscitava o efeito desejado, isto é, não inibia a produção do gás amoníaco (ver capítulo 3). Por outro lado, os métodos utilizados apresentavam algumas limitações operacionais, nomeadamente a impossibilidade de garantir que a composição da cama de aviário era igual nos diferentes reactores utilizados nos estudos comparativos, o que limitou o alcance das conclusões a retirar desses mesmos estudos.

Com vista a conseguir mais informação sobre a suspensão bacteriana estudada para além da disponibilizada pelo fabricante, procedeu-se a um estudo microbiológico da mesma. Um aspecto curioso da suspensão utilizada consiste no facto de, apesar de esta suspensão, de acordo a informação disponibilizada pelo fabricante, conter enzimas e esporos bacterianos estabilizados e micronutrientes, não ser necessário mantê-la num ambiente estéril ou armazená-la a baixas temperaturas. Tal situação levou à suspeição de a suspensão poder estar contaminada ou “inactiva”, o que poderia explicar a sua aparente ineficácia.

A análise microbiológica realizada teve como principal objectivo a identificação da composição da suspensão de modo a possibilitar uma melhor compreensão do funcionamento da mesma e à verificação da eventual inactividade dos esporos bacterianos que se encontravam presentes. Assim, face à dificuldade técnica de identificar as enzimas, optou-se por verificar a existência dos esporos e avaliar se estes germinavam quando preparada a suspensão segundo as indicações dadas pelo fabricante e/ou inoculando o meio de cultura de triptona de soja (TSB). Desta forma, após um período de incubação de 24h, foram feitos vários testes para identificar a composição da suspensão.

Foram realizados vários ensaios, de modo a otimizar o procedimento de identificação das bactérias ou esporos presentes na suspensão.

5.1. Aplicação de técnicas de coloração para a caracterização da suspensão biológica

Para identificar a composição da suspensão biológica foram adoptadas técnicas de coloração que permitem uma melhor visualização de microrganismos ao microscópio, bem como possibilitam a identificação dos mesmos. Foram utilizadas três técnicas de coloração: a coloração com azul-de-metileno, a coloração de Gram e a coloração com verde malaquita.

5.1.1. Procedimento experimental

De seguida são apresentadas as diferentes técnicas de coloração utilizadas para a caracterização da suspensão biológica bem como o procedimento experimental seguido para cada uma das técnicas.

A. Coloração com azul-de-metileno

Uma das vantagens da utilização deste método de coloração é a de permitir a observação das células *in vivo* sem que seja necessária a fixação em lâmina, não correndo o risco de promover alterações no tamanho e forma das células. Assim, mantendo a viabilidade dos microrganismos é possível observar tanto o seu comportamento como a sua morfologia (Alexander, *et al.* 2003; Benson, 2001).

- **Procedimento experimental**

Para a aplicação da técnica de coloração com azul-de-metileno seguiram-se os seguintes procedimentos:

- 1) Colocar uma pequena quantidade da suspensão biológica num tubo de ensaio;
- 2) Adicionar uma gota de azul-de-metileno ao tubo de ensaio e agitar bem;
- 3) Colocar uma gota da suspensão corada numa lâmina limpa e tapar com uma lamela, evitando a formação de bolhas de ar;
- 4) Observar ao microscópio óptico com a objectiva de imersão (100x).

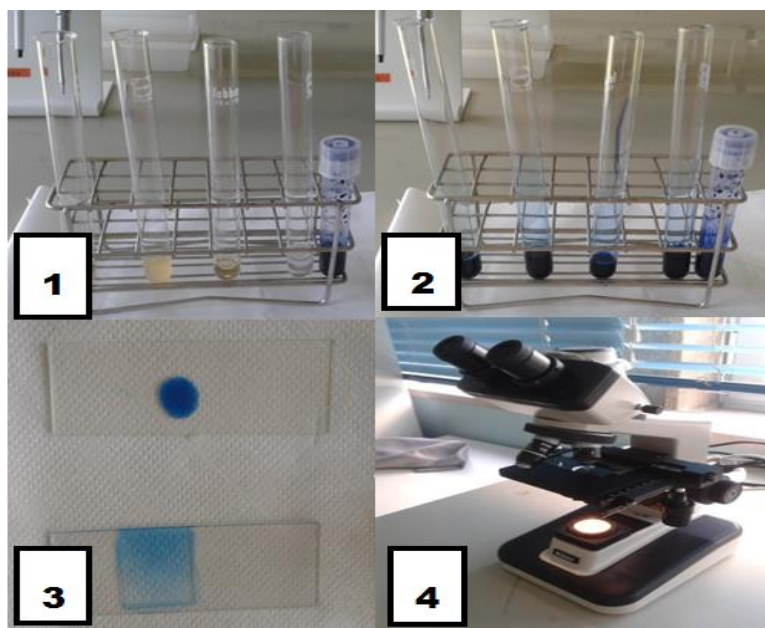


Figura 5.1 - Procedimento experimental da técnica de coloração com azul-de-metileno.

B. Coloração Gram

Esta técnica de coloração é uma das mais utilizadas em bacteriologia. A coloração diferencial que exige a realização de várias etapas de coloração e descoloração, permite diferenciar bactérias de acordo com a composição da sua parede celular. As bactérias Gram-positivas, ao contrário das Gram-negativas, apresentam uma parede de peptidoglicano espessa. Em contrapartida, as bactérias Gram-negativas contêm uma camada de lipopolissacarídeo como parte de sua parede celular. Deste modo, quando é aplicado cristal de violeta e iodo (ex. lugol) nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, estes atravessam a parede celular penetrando no interior da célula, combinam-se e formam um complexo. Posteriormente, com a aplicação do álcool etílico, nas bactérias Gram-negativas os lípidos da membrana externa da parede celular são removidos, resultando num aumento da sua permeabilidade e consequente remoção do complexo violeta de cristal-iodo do interior destas células, pelo que as bactérias são descoradas. Como resultado, as células Gram-negativas permanecem incolores até que sejam contra-coradas com safranina, após o qual se tornam rosa. Já as bactérias Gram-positivas, por estas apresentarem baixo teor lipídico na parede celular, ao se aplicar álcool as células são desidratadas o que resulta na redução da permeabilidade da parede e na retenção do complexo violeta de cristal-iodo. Em resumo, as células Gram-positivas como retêm o corante, permanecem roxas/violeta e as células Gram-negativas, como não retêm o corante, são incolores até contrastadas com um corante rosa (safranina) (figura 5.2).

Este método de coloração compreende quatro etapas principais (Lammert, 2007; Collins *et al.*, 1998; Tortora, *et al.*, 2007):

- 1) Aplicação do corante violeta de cristal num esfregaço fixado termicamente, que cora todo o citoplasma de violeta, independentemente do tipo de célula;
- 2) Adição de um mordente, que tem como função o aumento da afinidade entre o corante cristal de violeta e a célula e cria no interior da célula um meio insolúvel;
- 3) Descoloração rápida com álcool, que irá provocar a destruição da membrana lipídica nas bactérias Gram-negativas, aumentando a sua permeabilidade e causando a sua descoloração. No caso das bactérias Gram-positivas, como estas não contêm uma espessa camada lipídica, a aplicação do álcool irá provocar a desidratação destas células, reduzindo a permeabilidade da sua parede celular ficando assim retido o complexo violeta de cristal-iodo;
- 4) Contra coloração com safranina, que cora o citoplasma das células Gram-negativas de rosa, uma vez que apenas estas foram descoradas.

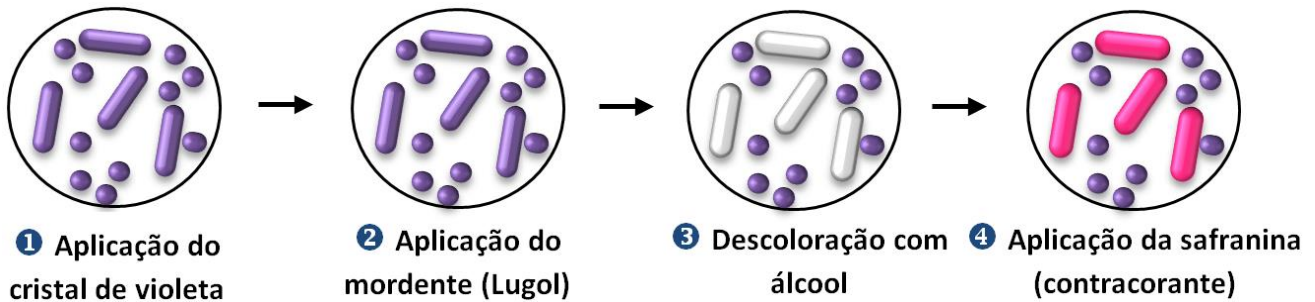


Figura 5.2 - Quatro etapas principais do método de coloração Gram.

- **Procedimento experimental**

Para a aplicação da técnica de coloração Gram seguiram-se os seguintes procedimentos:

- 1) Colocar uma gota da suspensão a analisar sobre uma lâmina limpa;
- 2) Espalhar o líquido numa área de aproximadamente 1cm^2 e deixar secar ao ar durante cerca de 60 segundos;
- 3) Passar a lâmina por chama cerca de três vezes com, para garantir a fixação do material, auxílio de uma mola de madeira (as passagens pela chama devem de ser rápidas e não se deve aquecer demasiado a lâmina para não danificar o seu conteúdo);
- 4) Corar essa zona do esfregaço com uma gota de cristal de violeta e agitar suavemente durante um minuto;
- 5) Enxaguar suavemente com água destilada;
- 6) Cobrir com o mordente lugol e agitar suavemente durante um minuto;
- 7) Enxaguar com água destilada e secar suavemente com papel absorvente;
- 8) Descorar com álcool etílico 96% durante 15-30 segundo;
- 9) Secar suavemente com papel absorvente;
- 10) Contracorar com safranina durante um minuto;
- 11) Enxaguar com água destilada e secar suavemente com papel absorvente;
- 12) Observar ao microscópio óptico com a objectiva de imersão (100x).

C. Coloração com verde de malaquita

A utilização desta técnica tem como objectivo final a identificação de esporos e endósporos (esporos que estão no interior da célula e que ainda não foram libertados par o meio de cultura). Apesar da parede dos esporos apresentar uma barreira eficaz contra a entrada e saída de materiais, quando exposto durante um período prolongado ao corante verde malaquita, sujeito a aquecimento, permite o rompimento desta barreira. Assim,

quando corados com verde de malaquita, os esporos apresentam uma coloração verde intensa. De forma a facilitar a diferenciação dos esporos das outras estruturas, utiliza-se a safranina como contracorante. Deste modo, quando é feita a observação de endósporos, visualizam-se estruturas coradas de rosa que são as células e no interior estruturas verdes que são os endósporos (Cappuccino e Shaman, 1999; Lammert, 2007; Collins *et al.*, 1998; Tortora *et al.*, 2007).

- **Procedimento experimental**

Para a aplicação da técnica de coloração com verde de malaquita seguiram-se os seguintes procedimentos:

- 1) Colocar uma gota da suspensão a analisar sobre uma lâmina limpa;
- 2) Espalhar o líquido numa área de aproximadamente 1cm^2 e deixar secar ao ar durante cerca de 60 segundos;
- 3) Passar a lâmina por chama cerca de três vezes com, para garantir a fixação do material, auxílio de uma mola de madeira (as passagens pela chama devem de ser rápidas e não se deve aquecer demasiado a lâmina para não danificar o seu conteúdo);
- 4) Marcar a zona do esfregaço fixado termicamente que se pretende analisar com um círculo à volta;
- 5) Cobrir o esfregaço com o corante verde malaquita;
- 6) Aquecer água num gobelé até começar a sair vapor;
- 7) Colocar a lâmina sobre o gobelé, mantendo o corante aquecido com o vapor por 5 minutos;
- 8) Afastar do vapor e após 1 a 2 minutos repetir a operação por 3 a 4 vezes;
- 9) Lavar suavemente com água destilada;
- 10) Contracorar com solução de safranina por 30 segundos;
- 11) Enxaguar com água destilada e secar suavemente com papel absorvente;
- 12) Observar ao microscópio óptico com a objectiva de imersão (100x).

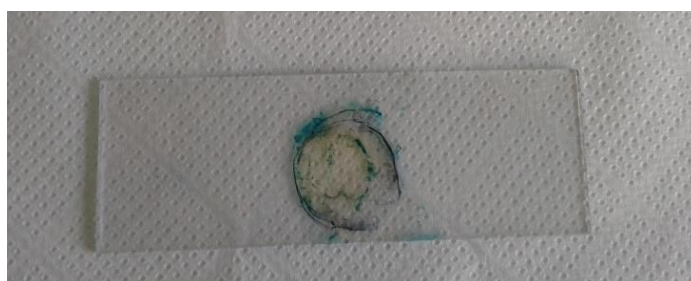


Figura 5.3- Lâmina corada com verde malaquita.

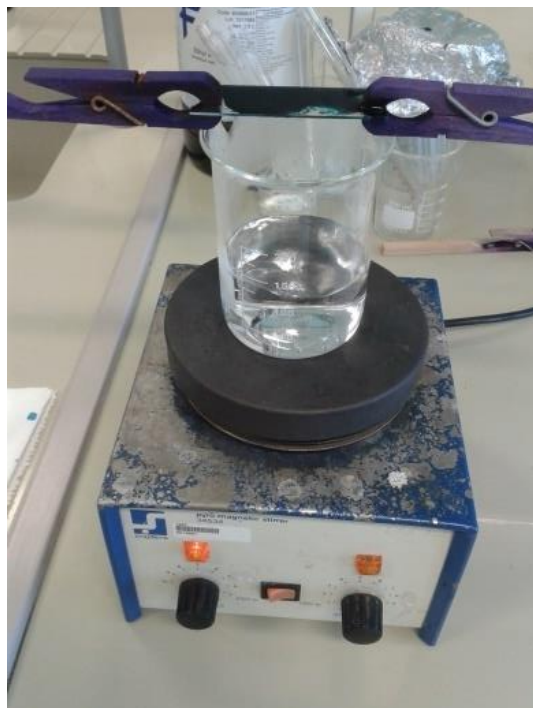


Figura 5.4 - Método de fixação do corante verde malaquita.

5.1.2. Material, Reagentes e Equipamentos

Para a implementação das técnicas de coloração foram utilizados os reagentes que se encontram de seguida tabelados.

Tabela 5.1- Reagentes utilizados nas técnicas de coloração e respectivas características.

Reagentes	Pureza (%)	Lote	Validade	Marca
Álcool etílico	70% e 96%	-	-	Continente
Cristal de violeta	-	1.09218.2500	30/09/2014	Merck
Solução de lugol	-	17788	7/2010	Scharlau Microbiology
Sol. de safranina 0.25%	3%	1341691	-	Fluka Biochemika
Sol. de azul-de-metileno 2%	1%	37311	1/2004	Lecifarma

Verde malaquita	-	5273675	-	Merck
Óleo de imersão	-	-	-	-
Água destilada	-	-	-	-
Suspensão biológica Jass	-	1101	-	Jass, Bio-systems Europe

Além dos reagentes anteriormente apresentados, foram necessários também diversos materiais e equipamentos que se encontram apresentados seguidamente.

Tabela 5.2 - Material e equipamentos utilizados nas técnicas de coloração.

Material de vidro	Material diverso	Equipamento
Lâminas	Bico de Bunsen	
Lamelas	Papel absorvente	Microscópio óptico Optika microscopes e Alphaphot-2YS2 Nikon
Tubos de ensaio	Molas de madeira	
Pipetas de Pasteur	Fósforos	Placa de aquecimento
Gobelé	Marcador	Snijders
	Suporte de tubos de ensaio	

5.1.3. Resultados e discussão

As técnicas de coloração foram aplicadas na própria suspensão biológica, sem se realizar qualquer diluição. Preparou-se uma lâmina para cada uma das colorações (coloração com azul-de-metileno, coloração Gram e por fim coloração com verde malaquita), seguindo os procedimentos correspondentes a cada uma das técnicas de coloração e posteriormente foi feita a observação ao microscópio de cada uma delas.

A. Coloração com azul-de-metileno

Através desta coloração foi possível observar pequenos “microrganismos” com forma de cocos. Nenhum deles apresentava mobilidade. Como, de acordo com a indicação do fornecedor, a formulação em estudo contém esporos de *Bacillus sp.*, os microrganismos observados deveriam apresentar forma de bastonete e não de cocos. Como tal não se verificou e se observou células em forma de cocos de dimensões muito pequenas, foi necessário através de outras técnicas verificar se se tratavam de outros microrganismos contaminantes ou de esporos.

B. Coloração Gram

Quando analisada a lâmina em que foi feita a coloração Gram, observaram-se microrganismos com forma de cocos, corados de azul/violeta. Tal como foi explicado anteriormente, no caso da parede celular das bactérias Gram-positivas, como estas contêm uma espessa camada de peptidoglicano e uma fina camada de lípidos, no final do processo de coloração com esta técnica deveriam apresentar uma coloração violeta. No caso de se tratar de bactérias Gram-negativas, como a sua parede celular contém apenas uma fina camada de peptidoglicano e alto teor de lípidos, deveriam apresentar uma cor rosada no final de aplicada desta coloração. Assim, e segundo as explicações apresentadas anteriormente, as células observadas seriam de bactérias Gram-positivas. Contudo, as células observadas apresentavam dimensões muito reduzidas e através desta técnica não foi possível concluir se o que se visualizava no microscópio seriam células de microrganismos ou se seriam esporos que ficariam corados na sua parede externa. Assim sendo, este ensaio apresentou-se inconclusivo, sendo necessário recorrer à coloração de verde malaquita.

C. Coloração com verde de malaquita

Ao observar a lâmina corada com verde malaquita ao microscópio, constatava-se uma vez mais a presença dos microrganismos de pequenas dimensões com a forma de cocos, desta vez corados de verde. Tal como foi referido anteriormente, esta técnica possibilita a visualização de endósporos, isto é esporos que estão no interior da célula e que ainda não foram libertados para o meio de cultura. Quando tal acontece, visualizam-se estruturas coradas de rosa que são as células e no interior estruturas verdes, os endósporos. O facto de nesta experiência não se terem visualizado células de microrganismos coradas de rosa e de se visualizarem apenas estruturas coradas de verde, poderá indicar que no meio analisado estavam presentes apenas esporos.

Se as células observadas se tratavam de esporos, nas outras colorações realizadas não se deveria ter observado qualquer coloração. Contudo a coloração observada poder-se-ia

dever à coloração do seu exterior e não do seu interior, o que era muito difícil de distinguir devido dimensões muito reduzidas dos microrganismos ou esporos.

Ao analisar os resultados obtidos nas três técnicas de coloração não foi possível concluir de forma clara se a suspensão em estudo contém bactérias ou esporos. Efectivamente os resultados obtidos com a técnica de coloração com verde de malaquita parecem indiciar que a suspensão é composta por esporos, uma vez que corou de verde. No entanto, se os pequenos microrganismos identificados fossem esporos, não deveriam corar com a coloração Gram nem com o azul-de-metileno, conforme se verificou. Contudo a coloração observada nestas duas técnicas poderia ser externa e não interna, o que não foi possível confirmar devido às dimensões muito reduzidas dos microorganismos observados. Por outro lado, se a suspensão fosse constituída por bactérias, deveriam corar de rosa quando sujeitos à técnica de coloração com verde de malaquita e não de verde, como se observou. Pode-se pois concluir que muito provavelmente a suspensão é constituída por esporos livres, permanecendo, contudo, a dúvida de se estes germinam nas condições utilizadas e se teriam a capacidade de inibir a conversão da ureia em amoníaco.

5.2. Estudo da suspensão biológica após diluição e inoculação em meio TSB

Uma vez que no ensaio anterior não foi possível esclarecer cabalmente a composição da suspensão, procedeu-se a um novo ensaio em que se avaliou o efeito de diluição da suspensão original e da variação da temperatura de incubação. Para o efeito estudou-se a eventual germinação dos esporos num meio de triptona de soja (TSB), em diferentes condições de incubação.

5.2.1. Procedimento experimental

- 1) Pesar 4.5g de meio TSB na balança com auxílio do vidro de relógio e da colher;
- 2) Transferir o conteúdo para o matraz de 500mL utilizando o funil para evitar perdas;
- 3) Adicionar 150mL de água destilada e agitar bem;
- 4) Dividir este conteúdo pelos 3 matrizes de 100mL, colocando 50mL de meio em cada um deles;
- 5) Tapar a sua abertura com uma rolha de gaze e com papel de alumínio e colocar na autoclave durante 15 minutos a 120°C;
- 6) Depois de esterilizados, deixar arrefecer até aos 37°C e inocular cada um deles com o auxílio de uma pipeta esterilizada e junto à chama de bico de Bunsen de forma a realizar este processo num ambiente estéril, inoculando-os da seguinte forma:

- a. Com 1mL de suspensão diluída a 12.8% e preparada conforme as indicações do fabricante e posteriormente colocar na incubadora a 30°C;
- b. Com 1mL da suspensão biológica concentrada e colocar na incubadora a 30°C;
- c. Com 1mL da suspensão biológica concentrada e incubado à temperatura ambiente.

Após 24h já se verificava crescimento, sendo que o matraz que continha suspensão diluída apresentava muito maior turvação que os outros dois, o que poderia indicar uma possível contaminação através da água destilada utilizada na diluição ou ao favorecimento induzido pela mesma na germinação dos esporos. Para averiguar o que continham cada um dos matrizes foram preparadas duas lâminas coradas com azul-de-metileno para cada matraz.

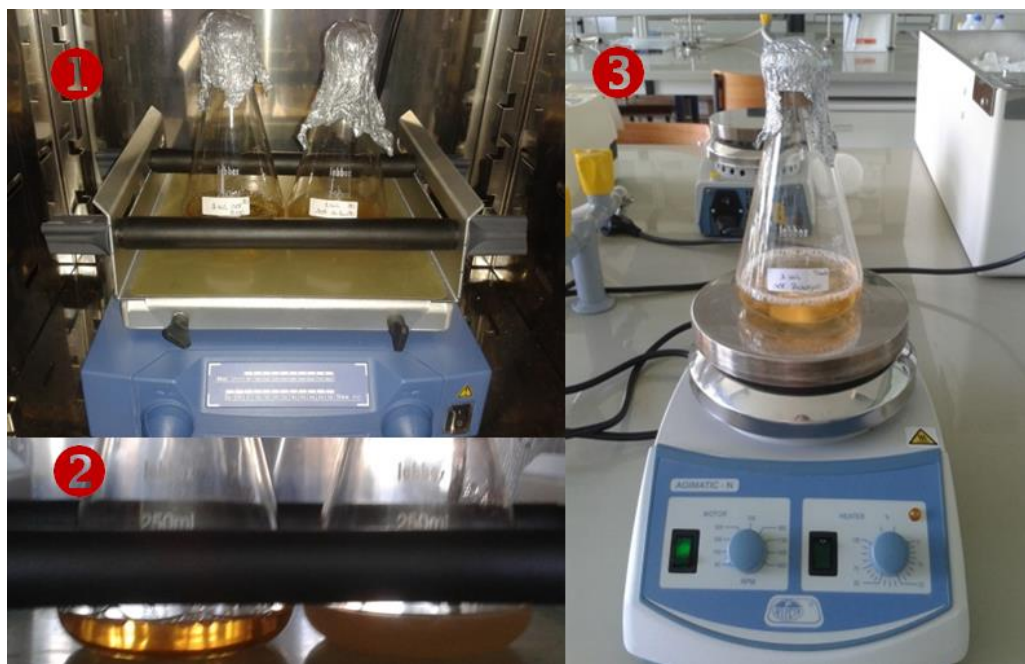


Figura 5.5 - Fotografia dos dois matrizes colocados a incubar (1); à esquerda o matraz inoculado com suspensão concentrada, e à direita com suspensão diluída a 12.8%. Por baixo (2) é evidenciada a maior turbidez do matraz com suspensão diluída. (3) Fotografia dos matraz colocado à temperatura ambiente inoculado com suspensão biológica concentrada.

5.2.2. Material Reagentes e Equipamento

Na tabela que se segue apresenta-se o material utilizado para a preparação do meio TSB com o inóculo da suspensão biológica.

Tabela 5.3- Reagentes utilizados para a preparação dos meios de crescimento TSB com o inóculo da suspensão biológica em estudo e suas características.

Reagentes	Pureza (%)	Lote	Validade	Marca
Álcool etílico	70%	-	-	Continente
Meio TSB	-	919852	07/2015	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England
Água destilada	-	-	-	-
Suspensão biológica JASS	-	1101	-	Jass, Bio-systems Europe

Além dos reagentes anteriormente apresentados, foram necessários também diversos materiais e equipamentos que se encontram apresentados seguidamente.

Tabela 5.4- Material e equipamentos utilizados para a preparação dos meios de crescimento TSB com o inóculo da suspensão biológica em estudo.

Material de vidro	Material diverso	Equipamento
Matraz de 100mL e 500mL	Bico de Bunsen	Autoclave Trade Raypa
Pipetas graduadas de 1mL	Fósforos	Balança analítica modelo 440-33N da Kern
Vidro de relógio	Colher	
	Funil	Incubadora Incuterm Digit da Trade Raypa

5.2.3. Resultados e discussão

De seguida são apresentados os resultados deste estudo e a discussão dos mesmos.

A. Matraz com suspensão biológica concentrada a 30°C

Ao analisar ao microscópio óptico as lâminas coradas com azul-de-metileno, foi possível observar dois tipos de bactérias de forma ovóide ou esférica, umas de dimensões normais e outras muito pequenas. A densidade populacional deste estudo era relativamente maior do que a observada no estudo anterior (ver capítulo 5.1).

B. Matraz com suspensão biológica diluída a 30°C

Nesta lâmina a densidade bacteriana era muito elevada, o que já era de esperar tendo em conta a turbidez da suspensão. Ao observar a lâmina preparada com a suspensão corada de azul-de-metileno identificaram-se dois tipos de bactérias, umas de forma esférica (que uma vez mais apresentam duas dimensões diferentes) e outras em forma de bastonetes, sendo estes últimos os predominantes. A existência de microrganismos com a forma de bastonete e a elevada densidade microbiana aponta para uma possível germinação dos esporos de *Bacillus sp.*, favorecida provavelmente pela adição de água destilada.

C. Matraz com suspensão biológica concentrada à temperatura ambiente

Ao observar a lâmina corada com azul-de-metileno ao microscópio óptico foi possível distinguir bactérias de forma esférica de duas dimensões diferentes. Os organismos bem como a sua densidade são muito semelhantes ao observado na lâmina preparada com o matraz com suspensão biológica concentrada a 30°C, o que é justificável tendo em conta que a temperatura ambiente era próxima dos 30°C o que indica que os meios se encontram em condições semelhantes.

D. Suspensão biológica diluída (sem meio de cultura e à temperatura ambiente)

Da observação microscópica verificou-se que nesta suspensão a densidade de microrganismos era muito reduzida, o que é compreensível tendo em conta que se trata de uma suspensão bastante diluída. Apenas se identificaram organismos de forma esférica e todos eles apresentavam dimensões muito reduzidas.

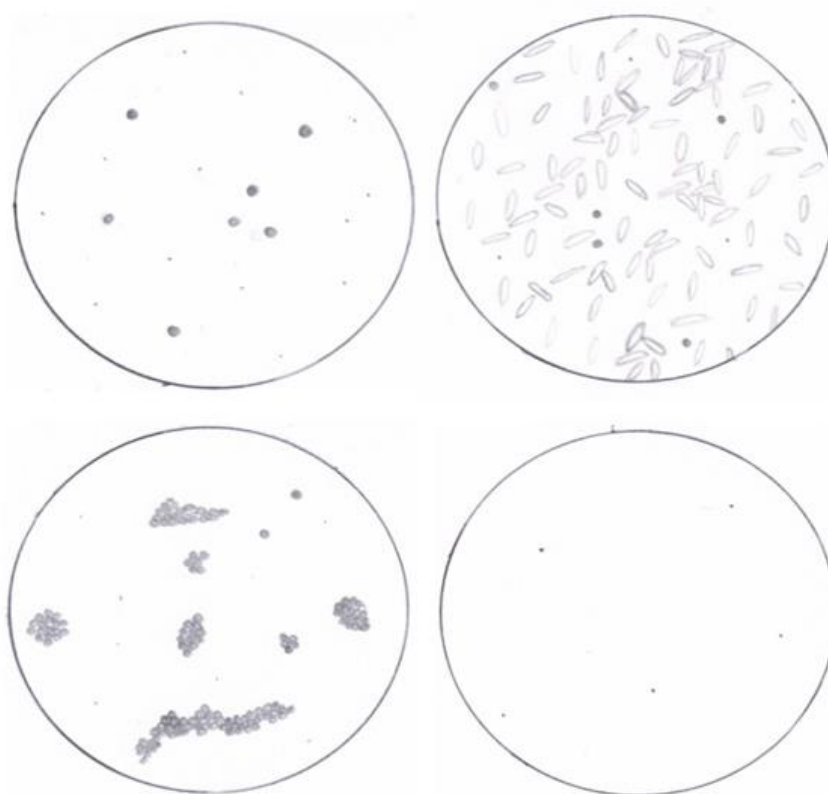


Figura 5.6 - Representação das imagens observadas ao microscópio ampliado 1000x (de cima para baixo e da esq. para a dir.): inoculação com suspensão concentrada a 30°C, inoculação com suspensão diluída a 30°C, inoculação com suspensão diluída à T_{ambiente} e por fim, suspensão diluída sem meio de cultura à T_{ambiente} .

Com os resultados obtidos nesta experiência verificou-se que quando inoculado um meio de cultura com a suspensão biológica e colocado a incubar por 24h há uma menor densidade populacional do que quando é preparada a suspensão de acordo com as indicações do fornecedor (na forma diluída e sem meio de crescimento), mesmo que esta seja colocada a incubar por 24h. Foi também possível observar a presença de microrganismos com a forma de bastonete quando inoculado meio de cultura com suspensão biológica diluída (preparada de acordo com as indicações dadas pelo fornecedor) colocada a incubar por 24h a 30°C., indiciando que a diluição favorece a germinação dos esporos. Contudo, não foi possível esclarecer se estes microrganismos têm origem da germinação dos esporos ou de uma contaminação provocada pela água destilada.

5.3. Despiste da possibilidade de ocorrência de contaminação com origem na água destilada

De forma a esclarecer se a presença de bastonetes se deve à ocorrência de uma contaminação ou à germinação dos esporos, foi realizado um novo ensaio, em que foram inoculados três matrizes com 50mL de meio TSB e posteriormente colocados a incubar a 30°C. O primeiro matraz foi inoculado com suspensão biológica concentrada, o segundo matraz foi inoculado com suspensão diluída conforme indicação do fornecedor e, por fim, o último matraz foi inoculado com água destilada. Assim, caso se verificasse crescimento bacteriano no matraz que continha apenas água destilada, e caso os microrganismos fossem semelhantes aos observados no ensaio anterior no matraz inoculado com suspensão diluída, poder-se-ia então corroborar a hipótese de que a presença de bastonetes se devia a uma contaminação com origem na água destilada.

5.3.1. Procedimento experimental

- 1) Preparar 150mL de meio TSB a 30g/L num matraz de 500mL com o auxílio do vidro de relógio e da colher e do funil;
- 2) Dividir este conteúdo pelos 3 matrizes de 100mL, colocando 50mL de meio em cada um deles;
- 3) Tapar a sua abertura com uma rolha de gaze e com papel de alumínio e colocar na autoclave durante 15 minutos a 120°C;
- 4) Depois de esterilizados, deixar arrefecer os matrizes contendo meio TSB até aos 37°C e inocular cada um deles com o auxílio de uma pipeta esterilizada e junto à chama de bico de Bunsen de forma a realizar este processo num ambiente estéril, inoculando-os da seguinte forma:
 - a) Com 1mL de suspensão diluída a 12.8% e preparada conforme as indicações do fabricante e posteriormente colocada a incubar a 30°C;
 - b) Com 1mL da suspensão biológica concentrada e incubado a 30°C;
 - c) Com 1mL de água destilada e incubado a 30°C.



Figura 5.7- Fotografia dos três matrizes após incubação por 48h. À esquerda o matraz inoculado com suspensão concentrada, no meio o matraz inoculado com suspensão diluída 12.8% e, por fim, à direita o matraz inoculado com água destilada.

5.3.2. Material, Reagentes e Equipamentos

Os materiais, reagente e equipamentos utilizados neste trabalho são os mesmos que se encontram indicados no capítulo 5.2.2.

5.3.3. Resultados e discussão

De seguida são apresentados os resultados deste estudo e a discussão dos mesmos.

A. Matraz com suspensão biológica concentrada

Tal como no matraz do capítulo 5.2 preparado com suspensão biológica concentrada a 30°C, observam-se microrganismos com forma esférica de duas dimensões diferentes, podendo tratar-se os de menores dimensões de esporos.

B. Matraz com suspensão biológica diluída

Na observação microscópica identificou-se também nesta suspensão, tal como no trabalho descrito no capítulo 5.2, dois tipos células, umas de forma esférica e bactérias em forma de bastonete. Todas as células esféricas observadas apresentavam dimensões muito reduzidas, o que poderá indicar que se trata de esporos.

C. Matraz com água destilada

Ao analisar ao microscópio óptico a lâmina preparada com o meio inoculado com água destilada, observaram-se células de forma esférica, contudo todos eles apresentavam dimensões normais para bactérias. Identificaram-se também bactérias com a forma de bastonetes, mas em menor quantidade relativamente aos cocos.

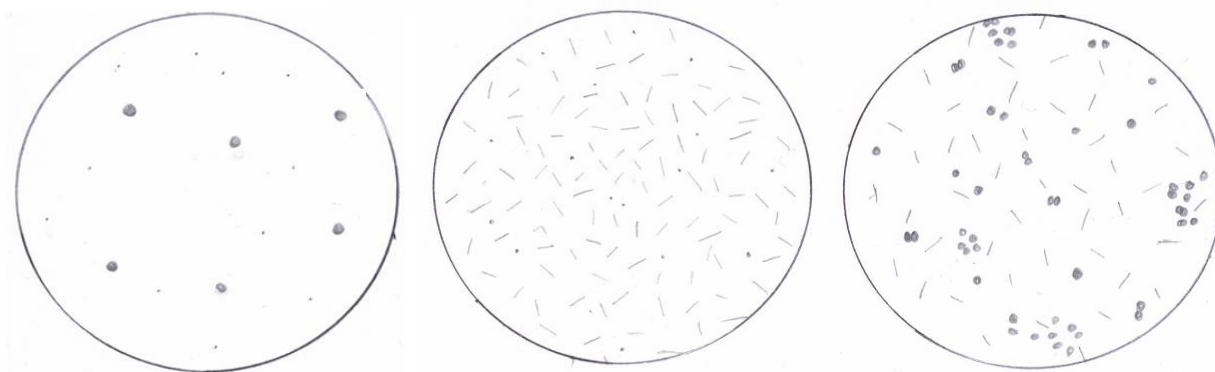


Figura 5.8- Representação das imagens observadas ao microscópio ampliado 1000x (da esquerda para a direita): inoculação com suspensão concentrada (A), inoculação com suspensão diluída a 30°C (B) e por fim inoculação com água destilada (C).

Através deste ensaio conclui-se que a presença dos microrganismos observados na suspensão diluída com a forma de bastonete se deve à germinação dos esporos de Bacillus sp. presentes na formulação biológica. Apesar da água destilada conter microrganismos com a forma de bastonetes, a quantidade em que estes se encontram na mesma não justifica a grande densidade em que se encontram na suspensão diluída contrariamente à suspensão que contém apenas água destilada. Pode-se concluir também que a elevada diluição da formulação biológica parece favorecer a germinação dos esporos, uma vez que quando preparada a suspensão sem prévia diluição, não se verifica a presença de microrganismos com a forma de bastonete. Contudo, caso a adição de água seja o factor que favorece a germinação dos esporos, o mesmo acontecerá se for utilizada água destilada estéril. Assim, e de forma a descartar completamente a hipótese de contaminação, procedeu-se a um novo ensaio em que se utilizou água destilada estéril e água destilada para verificar se os microrganismos presentes em ambos os ensaios eram semelhantes.

5.4. Despiste da possibilidade de ocorrência de contaminação com origem na água destilada utilizando água estéril

Para clarificar que realmente não ocorreu uma contaminação provocada pela água destilada, realizou-se um novo ensaio em que, além de água destilada, se utilizou também água destilada estéril. Assim, consoante os resultados obtidos foi possível compreender se a presença de bactérias com a forma de bastonetes se deveu a uma contaminação ou à criação de condições favoráveis para a germinação dos esporos. Para o efeito, prepararam-se cinco matrizes, todos eles contendo 50mL de meio TSB e inocularam-se da seguinte forma:

Matraz 1 – 1mL de suspensão biológica diluída a 12.8% em água destilada (conforme indicações do fabricante);

Matraz 2 – 1mL de suspensão biológica diluída a 12.8% em água destilada estéril (conforme indicações do fabricante);

Matraz 3 – 1mL de suspensão biológica concentrada;

Matraz 4 – 1mL de água destilada;

Matraz 5 – 1mL de água destilada estéril.

5.4.1. Procedimento experimental

- 1) Pesar 7.5g de meio TSB na balança com auxílio do vidro de relógio e da colher;
- 2) Transferir o conteúdo para o matraz de 500mL utilizando o funil para evitar perdas;
- 3) Adicionar 250mL de água destilada e agitar bem;
- 4) Dividir este conteúdo pelos 5 matrizes de 100mL, colocando 50mL de meio em cada um deles;
- 5) Colocar cerca de 30mL de água destilada num matraz de 50mL;
- 6) Tapar a abertura dos matrizes contendo TSB e do matraz contendo água com uma rolha de gaze e com papel de alumínio e colocar na autoclave durante 15 minutos a 120°C;
- 7) Depois de esterilizados, deixar arrefecer os matrizes contendo meio TSB até aos 37°C e inocular cada um deles com o auxílio de uma pipeta esterilizada e junto à chama de bico de Bunsen de forma a realizar este processo num ambiente estéril, inoculando-os da seguinte forma:
 - a. Com 1mL de suspensão diluída a 12.8% e preparada conforme as indicações do fabricante e posteriormente colocada a incubar a 30°C;
 - b. Com 1mL da suspensão biológica diluída a 12.8% com água destilada estéril preparada conforme as indicações do fabricante e incubado a 30°C;

- c. Com 1mL da suspensão biológica concentrada e posteriormente incubada a 30°C;
- d. Com 1mL de água destilada estéril e incubado a 30°C;
- e. Com 1mL de água destilada estéril (a água autoclavada) e incubado a 30°C.

Depois de incubados durante 24h a 30°C, os matrizes apresentavam o aspecto que se pode observar na Figura 5.9.



Figura 5.9- Matrizes após incubação por 24h a 30°C. Matrizes inoculados com (da esquerda para a direita) suspensão biológica diluída em água destilada, suspensão biológica diluída em água destilada estéril, suspensão biológica concentrada, água destilada e por fim água destilada estéril.

5.4.2. Material, Reagentes e Equipamentos

Os materiais, reagente e equipamentos utilizados neste trabalho são os mesmos que se encontram indicados no capítulo 5.2.2.

5.4.3. Resultados e discussão

De seguida são apresentados os resultados deste estudo e a discussão dos mesmos.

A. Matraz 1- Suspensão biológica diluída em água destilada

Ao examinar na lâmina esta suspensão corada com azul-de-metileno, foi possível observar uma elevada densidade bacteriana com a forma de bastonetes, com um aspecto

um pouco diferente do observado nos ensaios anteriores. Nos ensaios anteriores os bastonetes observados eram estreitos, e os bastonetes identificados nesta suspensão eram mais largos. Além das bactérias com a forma de bastonetes foi possível também identificar, embora numa quantidade muito reduzida, algumas células esféricas de pequenas dimensões que poderiam tratar-se de esporos que não germinaram.

B. Matraz 2-Suspensão biológica diluída em água destilada estéril

As imagens observadas ao microscópio óptico para esta suspensão foram muito similares às do matraz inoculado com suspensão biológica diluída em água destilada. Identificaram-se bactérias em forma de bastonete semelhantes e células esféricas de pequenas dimensões em quantidades vestigiais que uma vez mais que poderiam tratar-se de esporos que não germinaram.

C. Matraz 3-Suspensão biológica concentrada

Na observação microscópica identificou-se nesta suspensão dois tipos de bactérias, umas de forma esférica e outras em forma de bastonetes. Os cocos observados apresentavam as dimensões normais das bactérias, já os bastonetes eram semelhantes observados no capítulo 5.3 uma vez que eram mais estreitos que os observados no capítulo 5.4 nas soluções diluídas quer com água destilada, quer com água destilada estéril.

D. Matraz 4-Água destilada

Não apresentou crescimento.

E. Matraz 5-Água destilada estéril

Ao analisar ao microscópio óptico a lâmina preparada com o meio inoculado com água destilada estéril, observaram-se microrganismos com a forma de bastonete, grande parte deles organizados em cadeia. Os microrganismos presentes, apesar de terem o mesmo formato, têm dimensões mais reduzida que os observados nas duas soluções de suspensão biológica diluída deste mesmo ensaio e em menor quantidade. A presença destes microrganismos aponta para a ocorrência de uma contaminação, provavelmente numa das etapas pós-autoclavagem.

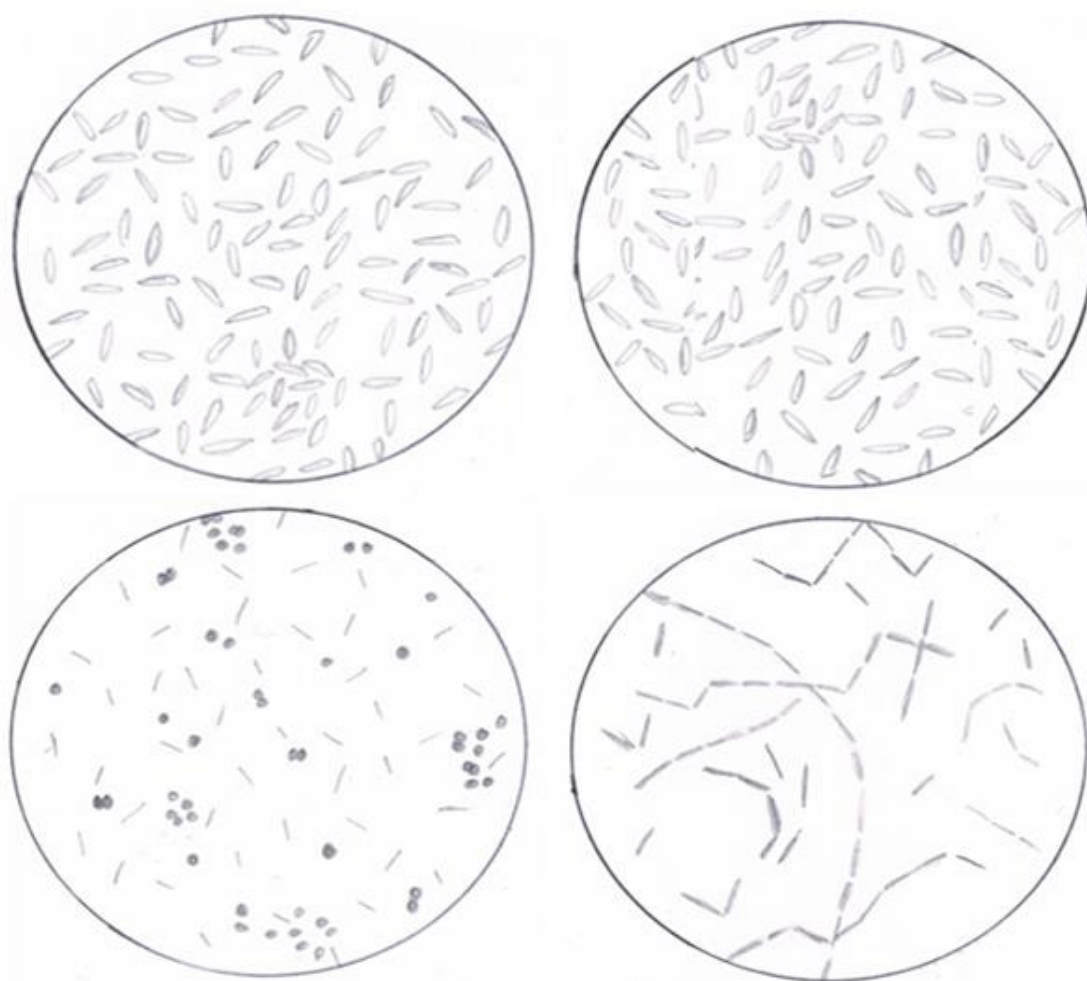


Figura 5.10- Representação das imagens observadas ao microscópio ampliado 1000x (de cima para baixo e da esq. para a dir.) dos meios de crescimento inoculados com: suspensão diluída em água destilada, suspensão diluída em água destilada estéril, suspensão concentrada e por fim água destilada estéril.

Dos resultados obtidos é possível confirmar que a presença de microrganismos com a forma de bastonete se deve à germinação de esporos e não à contaminação com origem na água destilada. Contudo, fica por esclarecer o motivo por que a germinação dos esporos apenas ocorre quando é feita a diluição prévia da formulação biológica, ou seja, quando a concentração desta formulação no meio é muito reduzida.

Como não foi também possível justificar os diferentes formatos de bacilos observados nos diferentes ensaios, procedeu-se à inoculação de placas de Petri na expectativa de esclarecer se se tratavam de diferentes microrganismos.

5.5. Inoculação de placas de Petri

Através do ensaio anterior (capítulo 5.4) verificou-se que todos os matrizes que continham suspensão biológica encontravam presentes bactérias com forma de bastonete. Contudo, nos matrizes que continham suspensão diluída as bactérias eram de maiores dimensões que os matrizes com suspensão concentrada. Para verificar se os microrganismos presentes nos matrizes com suspensão biológica diluída e concentrada são os mesmos e que têm origem na suspensão biológica, inocularam-se em duplicado a suspensão biológica em estudo concentrada e os meios preparados no 4º ensaio inoculados com a suspensão em estudo diluída e concentrada em 6 placas de Petri contendo ágar de Muller-Hinton.

5.5.1. Procedimento experimental

- 1) Inocular cada uma das seis caixas de Petri com o auxílio de uma zaragatoa esterilizada e junto à chama de bico de Bunsen e numa bancada previamente limpa com álcool de forma a realizar este processo num ambiente estéril, inoculando-os da seguinte forma:
 - a) Duas placas com meio de cultura com suspensão concentrada;
 - b) Duas placas com meio de crescimento com suspensão diluída a 12.8%;
 - c) Duas placas com suspensão biológica concentrada.
- 2) Incubar a 37°C durante 3 dias;
- 3) Observar e comparar as colónias de bactérias das diferentes caixas de Petri através da sua morfologia e aspecto característicos.

5.5.2. Material, Reagentes e Equipamentos

Se seguida são apresentados na tabela os materiais necessários para a realização deste ensaio.

Tabela 5.5 - Reagentes utilizados para a inoculação das placas de Petri com ágar de Muller-Hinton. e suas características.

Reagentes	Pureza (%)	Lote	Validade	Marca
Álcool etílico	70%	-	-	Continente
Meio ágar de Muller-Hinton	-	1.05437	08/10/2013	Merck

Além dos reagentes anteriormente apresentados, foram necessários também diversos materiais e equipamentos que se encontram apresentados seguidamente.

Tabela 5.6- Material e equipamentos utilizados para a inoculação das placas de Petri com agar de Muller-Hinton.




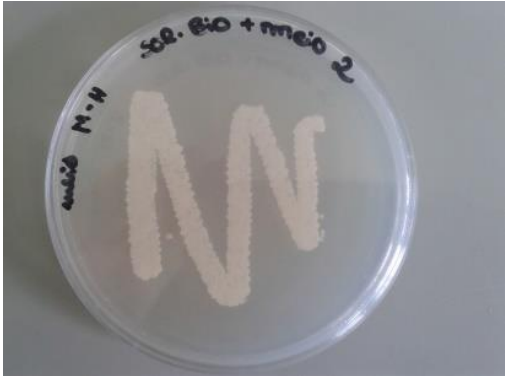

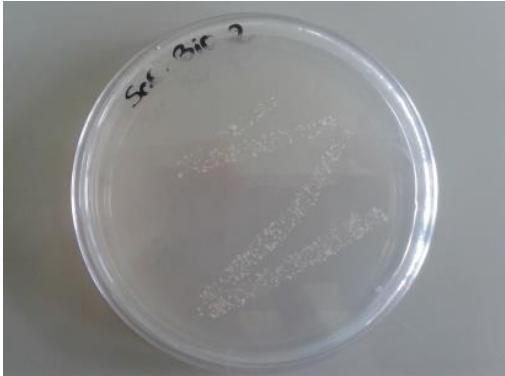
Material de vidro	Material diverso	Equipamento
Placas de Petri	Bico de Bunsen	Estereomicroscópio da Optika
	Fósforos	
	Zaragatoas	Incubadora Incuterm Digit da Trade Raypa

Todo o material foi devidamente esterilizado sendo submetido a temperaturas de 121°C durante 15 minutos numa autoclave.

5.5.3. Resultados e discussão

Depois de se verificar o crescimento e de se analisar atentamente as diferentes caixas de Petri verificou-se a presença de culturas com diferentes densidades, de aspecto brilhante e de coloração branca. A figura que se segue representa o crescimento microbiano registado nas diferentes caixas de Petri.

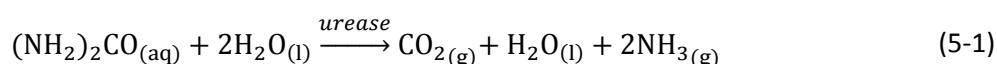
Tabela 5.7- Tabela de resultados das inoculações em caixas de Petri.

	Caixa 1	Caixa 2
Meio TSB+ Suspensão Biológica diluída		
Meio TSB + Suspensão Biológica		
Suspensão Biológica		

Como se pode verificar da observação das imagens anteriormente apresentadas, as colónias presentes nas caixas 1 e 2 com meio TSB com suspensão biológica concentrada apresentam uma densidade muito superior às das restantes caixas. De igual modo, as caixas inoculadas com meio TSB e suspensão diluída também apresentam maior densidade do que a caixa que contém apenas suspensão biológica sem meio de crescimento. Uma vez que os inóculos utilizados nas caixas que contêm meio de crescimento foram os mesmos que foram utilizados no último ensaio, portanto já tinha sido colocado a incubar previamente, já era previsível que a densidade das colónias destas caixas fosse superior às caixas que não contêm meio de crescimento. Contudo, apesar das diferentes densidades, todas as caixas apresentam bactérias com morfologia idêntica e apresentam sempre coloração branca. Em suma, uma vez que o aspecto das colónias em meio sólido é semelhante e também ao microscópio apresentavam a mesma forma, pode-se concluir que se trata de um único tipo de microrganismo.

5.6. Teste bioquímico para verificar a utilização de fontes de azoto- Teste da hidrólise da ureia

Algumas bactérias produzem a enzima urease, que tem a capacidade para hidrolisar a ureia em amoníaco e dióxido de carbono, segundo a equação seguinte.



Estas bactérias são denominadas urease positivas. Este teste, através da utilização do indicador de pH vermelho de fenol, permite a identificação deste tipo de microrganismo uma vez que a amoníaco ao reagir formando carbonato de amoníaco, torna o meio alcalino, passando de salmão (de um pH próximo de 6.8) a rosa (pH superior a 8.0). Assim, a passagem do meio para a tonalidade rosa indica a presença de estirpes urease positivas. Caso o meio se torne amarelo, significa que não ocorreu reacção e portanto a enzima urease não se encontra presente.

Para excluir a possibilidade de a suspensão biológica em estudo se encontrar contaminada com alguma espécie produtora da enzima urease, submeteu-se a mesma a este teste bioquímico (Lammert, 2007; Cappuccino e Shaman, 1999; Collins *et al.*, 1998).

5.6.1. Procedimento experimental

- 1) Inocular por picada a suspensão biológica no tubo de ensaio contendo ágar de ureia;
- 2) Incubar a 37°C durante 24 horas;
- 3) Observar a cor do meio de ágar de ureia de forma a verificar a presença/ausência da enzima urease.

5.6.2. Material, Reagentes e Equipamentos

Se seguida são apresentados na tabela os materiais necessários para a realização deste ensaio.

Tabela 5.8 - Reagentes utilizados no teste da hidrólise da ureia e suas características

Reagentes	Pureza (%)	Lote	Validade	Marca
Álcool etílico	70%	-	-	Continente
Meio de ágar de ureia	-	WJO65	11/2011	Himedia
Suspensão biológica JASS	-	1101	-	Jass, Bio-systems Europe

Além dos reagentes anteriormente apresentados, foram necessários também diversos materiais e equipamentos que se encontram apresentados seguidamente.

Tabela 5.9 - Material e equipamentos utilizados no teste da hidrólise da ureia.

Material de vidro	Material diverso	Equipamento
	Bico de Bunsen	
Tubo de ensaio com rolha	Fósforos	Incubadora Incuterm Digit da Trade Raypa
	Ansa	

5.6.3. Resultados e discussão

Após incubação durante 24 horas a 37°C, o tubo de ensaio que continha agar de ureia inoculado com a suspensão biológica apresentava o aspecto representado pela figura 5.11.



Figura 5.11- Fotografia do tubo de ensaio contendo agar de ureia após incubação.

Como se pode observar da imagem anteriormente apresentada, o agar de ureia após incubação permaneceu com a tonalidade de salmão na zona próxima da superfície do tubo, provavelmente porque o crescimento não foi suficiente para alterar a sua cor e na zona inferior apresentou uma cor amarelada.

Uma vez que o meio não alterou a sua tonalidade para rosa, indica que não se encontram presentes estirpes urease positivas, isto é, a suspensão não contém microrganismos produtores de urease.

**Cap.6- Avaliação da capacidade da suspensão biológica
estudada inibir o processo de formação de
amoníaco promovido pelo microorganismo *Proteus***



6. Avaliação da capacidade da suspensão biológica estudada inibir o processo de formação de amoníaco promovido pelo microorganismo *Proteus*

Para atestar a viabilidade da suspensão biológica em estudo procurou-se avaliar a sua capacidade para reduzir a conversão da ureia em amoníaco. Face à dificuldade em efectuar este estudo directamente na cama de aviário, conforme foi referido anteriormente, em particular no capítulo 3, procurou-se realizar essa determinação num meio de composição controlada.

6.1. Procedimento experimental

Para ultrapassar o problema da falta de homogeneidade da cama de aviário e por forma a assegurar que todos os ensaios numa etapa inicial apresentassem a mesma quantidade de azoto, decidiu-se recorrer a um meio artificial, com uma quantidade conhecida de ureia (a fonte de azoto que simula, neste estudo, as excreções das aves que contêm azoto sob a forma de ácido úrico). Para o efeito, criou-se um meio de cultura com composição semelhante ao meio de Triptona de Soja (TSB), uma vez que já se tinha verificado que neste meio os microrganismos presentes na suspensão apresentavam crescimento, mas isento de ureia. Este meio era constituído por 5g/L de cloreto de sódio, 2.5g/L de glucose e por fim 2.5g/L de hidrogenofosfato de dipotássio. Após preparação e esterilização na autoclave deste meio, adicionou-se 15mL de se uma solução aquosa de ureia a 40% esterilizada com auxílio de um filtro, uma vez que esta quando submetida a altas temperaturas torna-se instável, degradando-se. Deste modo, foi possível igualar a concentração de ureia em todos os meios de controlo. A concentração de 40% da solução aquosa foi seleccionada porque é o teor que garante uma concentração de ureia superior à que se encontra nas fezes das galinhas (Beck e Chang, 1980).

Prepararam-se para este ensaio 4 meios de controlo, sendo que todos eles continham o meio de cultura anteriormente apresentado, mas apenas foi adicionada a ureia em 3 deles. Os meios preparados consistiam no seguinte:

MC1 – Branco (apenas meio de cultura);

MC2 – meio de cultura, ureia e suspensão biológica concentrada;

MC3 – meio de cultura, ureia e inóculo de *Proteus vulgaris*;

MC4 – meio de cultura, ureia, suspensão biológica concentrada e inóculo de *Proteus vulgaris*.

Foi decidido utilizar a bactéria *Proteus vulgaris*, uma vez que este microorganismo é urease positivo, isto é, produz a enzima urease e por isso é capaz de degradar a ureia em amoníaco. Assim, com recurso a este microorganismo, consegue-se simular a degradação da ureia por parte dos microrganismos presentes na cama de aviário.

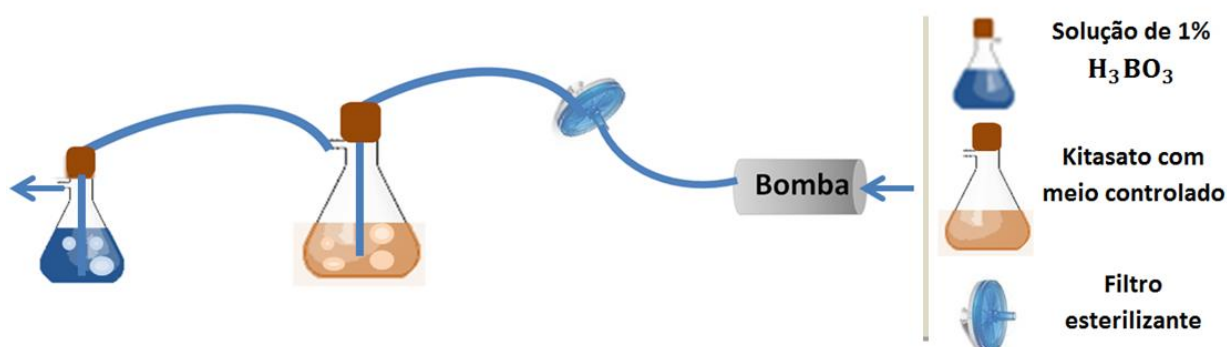


Figura 6.1- Esquema representativo do sistema de captura do amoníaco produzido nos meios de controlo.

Neste sistema é feito borbulhar ar, previamente esterilizado no filtro esterilizante, no interior do kitasato com meio de controlo. Posteriormente, esse gás é enviado para o kitasato que contém a solução de ácido bórico 1%, borbulhando no mesmo. No caso de o gás conter amoníaco, este reage com o ácido bórico, ficando retido na solução, cuja concentração foi determinada no analisador TOC/TN da Shimadzu, anteriormente descrito (capítulo 3.2).



Figura 6.2- Fotografia dos quatro sistemas de borbulhamento com os quatro meios de controlo.

Para a realização deste trabalho foi necessário preparar o meio de crescimento controlado, o inóculo de *Proteus vulgaris*, a solução de ureia 40% e por fim a suspensão biológica. Começou-se por preparar o inóculo 24 horas antes preparando-se 50mL de meio de cultura TSB à qual, após autoclavagem, se adicionou o inóculo de *Proteus vulgaris* e posteriormente foi colocado a incubar por 24h e a 37°C. Após o período de incubação preparou-se 1200mL de meio controlado contendo 5g/L de cloreto de sódio, 2.5g/L de glucose e por fim 2.5g/L de hidrogenofosfato de dipotássio. Este volume foi dividido por quatro kitasatos, ficando um deles com 300mL de meio e os restantes com 285mL. Depois de se ter dividido os meios de crescimento controlados e de colocadas as mangueiras e o filtro de ar de acordo com o esquema anteriormente apresentado, taparam-se todas as extremidades dos tubos dos kitasatos com algodão e papel de alumínio, rolharam-se os kitasatos com uma rolha de cortiça e autoclavaram-se os mesmos durante 15 minutos, a 120°C. Após autoclavagem adicionou-se 15mL de solução de ureia a 40% esterilizada com auxílio de filtros de seringa nos kitasatos que continham um volume de 285mL de meio perfazendo-se os 300mL. Além da ureia, inocularam-se os meios de controlo como anteriormente foi descrito: adicionou-se 10mL de suspensão biológica concentrada no meio de controlo 2 (MC2), 10mL de inóculo de *Proteus vulgaris* no meio de controlo 3 (MC3) e por fim 5mL de suspensão biológica concentrada e 5mL de inóculo de *Proteus vulgaris* no meio de controlo 4 (MC4). No meio de controlo 1 (MC1) não foi acrescentado nada ao meio de cultura.

Na tabela que se segue é apresentada a composição de cada um dos meios de controlo de forma simplificada.

Tabela 6.1- Descrição do conteúdo de cada um dos meios de controlo utilizados.

Meio	Meio cultura Controlado*	Ureia	Suspensão biológica	<i>Proteus vulgaris</i>
MC1	X			
MC2	X	X	X	
MC3	X	X		X
MC4	X	X	X	X
*O meio de crescimento utilizado era composto por glucose, cloreto de sódio e hidrogenofosfato de dipotássio.				

Todos estes procedimentos foram realizados cuidadosamente em ambiente esterilizado de forma a evitar contaminações. Por fim montou-se o sistema de acordo com o esquema representado anteriormente, igualaram-se e determinaram-se os caudais volumétricos debitados pelas bombas com o auxílio de um Rotâmetro (ROTA Apparat- und Maschinenbau) e deu-se início ao ensaio que teve uma duração de aproximadamente 72h.

6.2. Material Reagentes e Equipamento

Para a realização deste trabalho experimental foi necessário um conjunto de material como matrizes, balões volumétricos, kitsatos, pipetas, micropipetas, pontas de micropipetas, seringas, filtros de ar, filtro de seringa, tubos de silicone e rolhas de cortiça. Para as pesagens efectuadas utilizou-se uma balança analítica modelo 440-33N da Kern. Utilizou-se ainda, um termómetro, a incubadora a 37 °C Incuterm Digit da Trade Raypa, a Autoclave Trade Raypa na esterilização e por fim o aparelho TOC para a determinação do azoto total nas soluções de ácido bórico e no meio de controlo. O microorganismo teste usado foi o *Proteus vulgaris*. Na tabela 1 encontram-se descritos os reagentes utilizados nesta experiência.

Tabela 6.2 - Reagentes utilizados na realização experimental e suas respectivas características.

Reagente	Pureza (%)	Lote	Validade	Data abertura	Marca
Inóculo de <i>Proteus vulgaris</i>		Estirpe ATCC 33420			-
Ureia	99.5	AO 319021	-	-	Acros organics
Glucose	-	021110203	02/2014	-	Liofilchem s.r.l. Bacteriology products
NaCl	99	80294	-	-	Prolab, Rectapur
Suspensão biológica	-	1101	-	-	Jass, Bio-systems Europe
Hidrogenofosfato de dipotássio	99	0000249366	06/2016	06/2011	Panreac Química S.A.U.
Meio TSB	-	919852	07/2015	11/2012	Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, England
Ácido bórico	99.8	9636319	-	-	Merck

6.3. Resultados

Após deixar durante 72h o sistema a funcionar, foram recolhidas amostras quer das soluções absorventes, quer dos meios controlados para a determinação da concentração de azoto total no analisador TOC/TN. Os resultados obtidos encontram-se representados graficamente de seguida.

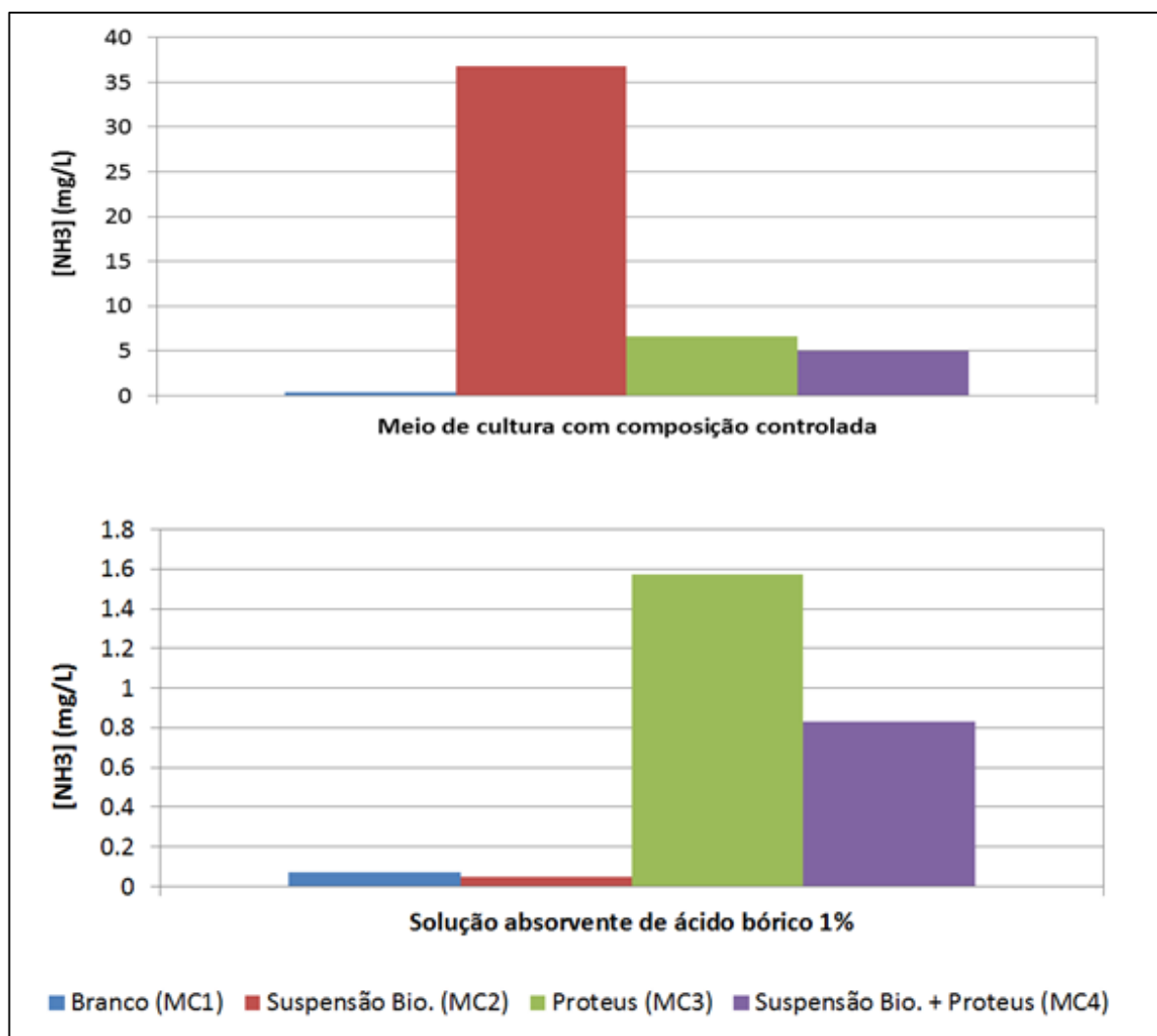


Gráfico 6.1- Concentração de compostos azotados (expressos como NH_3) determinados no meio de cultura (em cima) e na solução absorvente de ácido bórico a 1% (em baixo), após o período de 72 h de borbulhamento.

No meio Branco, como não foi adicionada ureia nem nenhum microrganismo capaz de converter a ureia em amoníaco, a concentração de azoto total encontrada em ambas as soluções deve-se apenas ao azoto atmosférico que eventualmente foi absorvido pelas soluções, e que se verifica ser muito reduzido, conforme se esperava. No meio com

suspensão biológica, como não foi adicionado nenhum microrganismo capaz de converter a ureia em amoníaco, toda o azoto adicionado através do composto ureia permanece na solução de meio controlado. Por esse motivo a solução de ácido bórico tem uma concentração muito reduzida de azoto, que deverá ter origem no ar atmosférico. Caso se verificasse a produção de amoníaco, tal poderia indicar que ou o meio de controlo ou a suspensão biológica estariam contaminados, o que não se observa. Quanto ao meio de crescimento inoculado apenas com *Proteus vulgaris*, sendo este um microrganismo produtor da enzima urease é por isso capaz de promover a conversão da ureia em amoníaco e dióxido de carbono. Assim sendo, e como se pode verificar pelos resultados obtidos, na solução de ácido bórico é absorvida elevada quantidade de amoníaco volatilizada do meio de cultura, atestando a significativa conversão da ureia em amoníaco. Por fim, no meio ao qual foi adicionado o *Proteus* e a suspensão biológica, verifica-se uma significativamente menor emissão de amoníaco quando comparada com o resultado obtido no meio de controlo 3, apenas com o *Proteus*, apesar de a quantidade de ureia adicionada em ambos os ensaios ser a mesma, Este resultado claramente comprova que o produto JASS teve a capacidade de inibir a actividade da enzima urease proporcionada pela presença do inóculo de *Proteus vulgaris*, e consequentemente, reduzir a capacidade de formação de amoníaco, quer seja pelo mecanismo de competição de nutrientes, quer por inibição da actividade enzimática. Pode-se então concluir que a suspensão biológica é eficiente, uma vez que a formação de amoníaco no meio com a presença de JASS foi claramente inferior à que ocorreu no meio isento de inibidor.

Cap.7- Conclusões e sugestões de trabalhos futuros



7. Conclusões e sugestões de trabalhos futuros

Com o presente trabalho pretendia-se testar a viabilidade da utilização do bioaumento na redução da emissão de amoníaco em aviários através da aplicação da suspensão biológica comercial JASS desenvolvido pela BIO-SYSTEMS EUROPE®. Esta suspensão, segundo as informações fornecidas pelo fabricante, é composta por bactérias estabilizadas, enzimas livres e micronutrientes e actua competindo pelo substrato com as bactérias já existentes na cama de aviário. Para testar a viabilidade desta suspensão, foram realizados ensaios laboratoriais e à escala real num aviário que permitiram monitorizar a libertação de amoníaco da cama de aviário.

Do conjunto de experiências realizadas à escala laboratorial, quer nos ensaios em reactor fechado, quer com circulação de ar, não foi possível tirar conclusões esclarecedoras quanto à eficiência da suspensão, presume-se que pelo facto de não ser possível garantir que a composição da cama de aviário fosse igual nos diferentes reactores utilizados nos estudos comparativos. Apenas no estudo da determinação do fluxo de amoníaco a diferentes cotas (descrito no capítulo 3.1.3) os resultados parecem indicar uma redução da emissão de amoníaco na ordem dos 13%, nas experiências em que se usou a mesma cama de aviário (fluxo mássico total de $32,67 \text{ mg}_{\text{NH}_3}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ e $30,68 \text{ mg}_{\text{NH}_3}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$, respectivamente)

Quanto aos resultados obtidos na unidade de recria, onde foi monitorizada a libertação de amoníaco a partir da cama de aviário que ia sendo formada, uma delas sem aplicação de suspensão e outra com aplicação do mesmo, verificou-se claramente uma menor concentração de amoníaco atmosférico nesta última campanha o que indicia uma clara eficiência da inibição da libertação de amoníaco da cama de aviário em resultado da aplicação do produto JASS. Verificou-se, ainda, o valor mais elevado de concentração de amoníaco observado foi de 8,2 e 4,8 ppm na 1ª e 2ª campanhas, respectivamente, claramente abaixo do valor máximo admissível previsto na legislação nacional.

Particularmente relevante, foi o facto de se ter observado uma notória redução da concentração de amoníaco nas primeiras 4 semanas de criação, período em que não se promove a ventilação da sala de recria, e que, por isso, apresenta em ambas as campanhas condições ambientais praticamente iguais, o que permite confirmar que a utilização da suspensão biológica inibe de forma relevante a volatilização do amoníaco, permitindo reduzir a necessidade de ventilação e, consequentemente, de aquecimento, com vantagens ambientais e energéticas importantes.

De referir, ainda, que não foi possível correlacionar os dados obtidos de concentração de amoníaco na sala de recria com os dados de mortalidade e de evolução do peso dos frangos disponibilizados pela Ovopor.

Face aos resultados inconclusivos dos ensaios à escala laboratorial, colocaram-se dúvidas relativamente ao que poderia estar a influenciar a actuação da suspensão, nomeadamente quanto ao tipo de microrganismos presentes. Procedeu-se, então, a um estudo microbiológico com o objectivo de conseguir caracterizar melhor a suspensão biológica estudada, para além da informação disponibilizada pelo fabricante, e verificar se a mesma se encontrava activa. Pelos ensaios de coloração realizados pode concluir-se que se trata de uma suspensão essencialmente composta por esporos de *Bacillus sp.*. Verificou-se, ainda, que a diluição da suspensão conduzia a melhores resultados no que se refere à germinação dos esporos, o que está de acordo com as instruções do fabricante da suspensão. Foram realizadas diversas experiências que despistaram a possibilidade de o aumento da densidade de microrganismos poder ter origem na contaminação pela água de diluição.

Este conjunto de experiências pode justificar alguns dos resultados inesperados obtidos no estudo do efeito do produto sobre a volatilização de amoníaco (terceiro capítulo), uma vez que em algumas experiências os ensaios em que se utilizou a solução mais diluída de JASS conduziu a melhores resultados do que os obtidos com concentrações mais elevadas. Finalmente, verificou-se que a suspensão não tem na sua composição, microrganismos produtores de urease, atestando que não se encontra contaminada por microrganismos que possam favorecer a formação de amoníaco, conforme se chegou a suspeitar face aos resultados inconclusivos obtidos no terceiro capítulo do presente trabalho.

Face à dificuldade observada nos ensaios laboratoriais em avaliar a eficiência da suspensão directamente na cama de aviário devido aos obstáculos anteriormente referidos, procurou-se realizar essa avaliação num meio controlado para que assim fosse possível corroborar os resultados obtidos à escala real, relativamente à eficácia da suspensão. Deste modo, procedeu-se a um outro estudo, no qual a cama de aviário foi substituída por uma solução com ureia de composição controlada, por forma a garantir igual concentração daquele composto nos vários ensaios comparativos, conseguindo-se, assim ultrapassar o principal obstáculo que tornou os estudos à escala laboratorial inconclusivos. Com esta experiência foi possível confirmar a eficácia da suspensão biológica, uma vez que quando comparado o desempenho dos dois reactores aos quais foram adicionados microrganismos *Proteus vulgaris* com capacidade de degradar a ureia, o reactor que continha a suspensão biológica registou uma redução de 47% da quantidade de amoníaco libertada. Este resultado claramente comprova que o produto JASS teve a capacidade de inibir a actividade da enzima urease proporcionada pela presença do inóculo de *Proteus vulgaris*, e consequentemente, reduzir a capacidade de formação de amoníaco.

Pode, pois, concluir-se que apesar de os resultados dos estudos de determinação do amoníaco libertado realizados à escala laboratorial não o terem suportado, todas as

restantes experiências indiciam um contributo significativo do produto JASS estudado para a inibição de formação de amoníaco e consequente libertação, provando a utilidade do mesmo na melhoria das condições ambientais dos aviários.

Este estudo poderá, ainda, ser melhorado com a realização de outras experiências que ajudariam a tornar mais sustentadas as conclusões acima referidas. Assim, como sugestão para trabalhos futuros, propõe-se a realização de um novo ensaio com meio controlado com vista a avaliar a evolução temporal do amoníaco libertado dos meios de controlo.

Ainda relativamente a este estudo, seria interessante realizar esta experiência utilizando microrganismos presentes na cama de aviário em vez do *Proteus*, de forma a confirmar a eficácia da suspensão sobre os mesmos.

Finalmente seria interessante determinar a composição de azoto e carbono total da cama de aviário antes e depois do estudo de monitorização do amoníaco libertado em reactor fechado de forma a ser possível realizar o balanço mássico e verificar se as várias amostras em estudo têm igual composição azotada. Deste modo poder-se-ia verificar a influência da adição da suspensão biológica na produção de amoníaco e no aumento de valor, enquanto aditivo agrícola, da cama de aviário, através da fixação de compostos azotados.

Bibliografia



Bibliografia

- Alexander, S. K., Strete, D., e Niles, M. J. (2003). *Laboratory Exercises in Organismal and Molecular*. The McGraw-Hill Companies.
- Al-Mashhadani, E., e Beck, M. (1985). Effect of atmospheric ammonia on the surface ultrastructure of the lung and trachea of broiler chicks. *Poultry Science*, 64(11), 2056-2061.
- Anderson, D., Beard, C., e Hanson, R. (1964). The Adverse Effects of Ammonia on Chickens Including Resistance to Infection with Newcastle Disease Virus Author. *Avian Diseases*, 8, No. 3, pp. 369-379.
- Anderson, N., Strader, R., e Davidson, C. (2003). Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. *Environment International*, 277-286.
- Bachrach, U. (1957). The aerobic breakdown of uric acid by certain pseudomonads. *Journal of General Microbiology*, 6 .
- Baêta, F., Abreu, P., Soares, P., Abreu, V., Silva, M., e Perdomo, C. (2000). Desempenho Produtivo e Bioeconômico de Frangos de Corte Criados em Diferentes. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 29(1), pp. 159-167.
- Beck, J. R., e Chang, T. S. (1980). Measurement of uric acid levels in chicken cecal contents. *Journal of Poultry Science*, 56, 1193-1196.
- Beker, A., Vanhooser, S. L., Swartzlander, J. H., e Teeter, R. G. (2004). Atmospheric Ammonia Concentration effects on broiler growth and performance. Poultry Science Association, Inc.
- Benson. (2001). *Microbiological Applications – Laboratory Manual in General Microbiology*, 8th edition. The McGraw-Hill Companies.
- Bleizgys, R., Bagdonienė, I., e Balezentienė, L. (2013). Reduction of the Livestock Ammonia Emission under the. *The ScientificWorld Journal*, Article ID 825437, 7 pages.
- Cappuccino, J., e Shuman, N. (1999). *Microbiology, A Laboratory manual*, 5th Edition. Benjamin Cummings.
- Carey, J. B. (2005). *Mitigation strategies for ammonia management*. Obtido em 10 de Dezembro de 2013, de <http://gallus.tamu.edu/Faculty/MitigationStrategiesforAmmoniaManagementProceedingsPaper>
- Carlile, F. S. (1984). Ammonia in Poultry Houses: A literature review. (G. Buildings, Ed.) *World's Poultry Science Journal*, 40, pp. 99-113.

- Charles , D. R., e Payne, C. G. (1966.). The influence of graded levels of atmospheric ammonia on chickens.I. Effects on respiration and on the performance of broilers and replacement growing stock. *Journal of Poultry Science*, pp. 7: 177-187.
- Collins, C., Lyne, P., e Grange, J. (1998). *Microbiological Methods, 7th Edition*. Butterworth Heinemann.
- Correia, L. P. (2010). *Avaliação de indicadores de Bem Estar em inspecção hígiosanitária de frangos abatidos para consumo*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro, Mestrado Integrado de Medicina Veterinária Ciências Veterinárias, Vila Real.
- Coufal , C., Chavez , C., Niemeyer, P., e Carey, J. (2006). Nitrogen emissions from broilers measured by mass balance. *Poultry Science*, 85, 384–391.
- Decreto-Lei nº 72-F/2003, de 14 de Abril.
- Decreto-Lei 79/2010 de 25 de Junho
- Dias, S. C., Silva, M. S., Guimarães, G. I., Lopes, M., e Sgarbossa, A. N. (s.d.). *Efeito do uso de ENZILIMP® AV como biodegradador de resíduos orgânicos em cama de aviários*. Universidade Estadual de Londrina - UEL. Londrina – P.R. s.d.
- Donlon, D. L., e Bauder, J. (s.d.). *A General Essay on Bioremediation of Contaminated Soil*. Montana State University-Bozeman .
- EPA. (2004). *National Emission Inventory—Ammonia Emissions from Animal Husbandry Operations*. United States Environmental Protection Agency (EPA).
- Ferguson, N., Gates , R., Taraba, J., Cantor , A., Pescator, A., Straw, M. (1998). The effect of dietary protein and phosphorus on ammonia concentration and litter composition in broilers. *Poultry Science*, 77, 1085-1093.
- Franco, J., e Fruhauff, M. (1997). Manejo para o controle de ascite, síndrome da morte súbita, stress por calor e coccidiose. *Curso de manejo de frangos de corte.*, (pp. 121-133). Campinas: FACTA.
- Garcia, R., Almeida Paz, I., Caldara , F., Pereira, D., Nääs , I., Freitas, L., (2010). Effect of the Litter Material on Drinking Water. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 12, pp. 165-169.
- Garcia, R. G., Caldara, F. R., e Paz, I. d. (s.d.). *Papel da cama na produção e bem estar de frangos de corte*. Universidade Federal da grande Dourados- Faculdade de ciências Agrárias.
- Garcia, R., Paz, I., e Caldara, F. (2011). Papel da cama na produção e bem-estar de frangos de corte. *Revista do Avisite*, 5 nº47, pp. 46-50.

- Gonçalves, J. S. (2013). *Estratégias de biorremediação para solos contaminados com o herbicida terbutilazina com base na bioadição de Pseudomonas sp. ADP*. Lisboa: Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências Departamento de Biologia Vegetal.
- Groot, K., e P. W. G. (1994). Review on emissions of ammonia from housing systems for laying hens in relation to sources, processes, building design and manure handling. *J. Agric. Eng. Res.*, 59:73–87.
- Han, I., e Lee, J. (2000). The role of synthetic amino acids in monogastric animal production. *Journal of Animal Science*, 13, 543–560.
- Hernandes, R., e Cazetta, J. O. (2001). Método Simples e Acessível para Determinar Amônia Liberada pela Cama Aviária. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 30(3), pp. 824-829.
- Hunde, A., Patterson, P., Ricke, S., e Kim, W. K. (2012). Supplementation of poultry feeds with dietary zinc and other minerals and compounds to mitigate nitrogen emissions- A Review. *Biol Trace Elem Res*, 147:386-394.
- Kling, H. F., e Quarles, C. L. (1974). Evaluation of ammonia and infectious bronchitis vaccination stress on performance and carcass quality. *Poultry Science*, pp. 1592-1596.
- Kuai, L., e Verstraete, W. (1998). Ammonium Removal by the Oxygen-Limited Autotrophic. *Applied and environmental microbiology*, 4500–4506.
- Lammert, J. (2007). *Techniques in microbiology: A student Handbook*. Benjamin Cummings.
- McDowell, R. (1974). *Bases biológicas de la producción animal en zonas tropicales* (1st ed.). Zaragoza: Acribia.
- Mickelberry, W., Rogler, J., e Stadelman, W. (1966). The influence of dietary fat and environmental temperature upon chick growth and carcass composition. *Poultry Science*, 45, pp. 13-321.
- Miles, D. M., Branton, S. L., e Lott, B. D. (2004). Atmospheric ammonia is Detrimental to the Performance of Modern Commercial Broilers. *Poultry Science*, 83:1650–1654.
- Nääs, I., Freitas, L., Seno, L., Ferreira, V., Pereira, D., Cavichiolo, F., (2010). Selecting appropriate bedding to reduce locomotion problems in broilers. *Brazilian Journal of Poultry Science*, 12, pp. 189-195.
- Natalie, A., Ross, S., e Cliff, D. (2003). Airborne reduced nitrogen: ammonia emissions from agriculture and other sources. *Environment International*, 29, pp. 277– 286.
- Nham, K. (2002). Efficient feed nutrient utilization to reduce pollutants in poultry and swine manure. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 32 (1), 1-16.
- Oderkirk, A. (2012). *Poultry Litter Management: Keeping Litter Dry*. AgraPoint.

- Olanrewaju, H. A., Miller, W. W., Maslin, W. R., Thaxton, J. P., Dozier, W. A., Purswell, J., (2007). Interactive effects of ammonia and light intensity on ocular, fear and leg health in broiler chickens. *International Journal of Poultry Science*, 6(10):762-769.
- Oyetunde, O. O., Thomson, R. G., e Carlson, H. D. (1978). Aerosol Exposure of Ammonia, Dust and Escherichia coli in Broiler Chickens. *The Canadian Veterinary Journal*, 19, pp. 187-193.
- Reece, F. N., Lott, B. D., e Deaton, J. W. (1980). Ammonia in the atmosphere during brooding affects performance of broiler chickens. *Journal of Poultry Science*, 59 n°3, pp. 486-488.
- Reese, E. (2010). Comparison of Agricultural Area Source Ammonia. Utah State University.
- Ritz, C. W., Fairchild, B. D., e Lacy, M. P. (2004). Implications of Ammonia Production. *Poultry Science Association, Inc.*
- Ritz, C. W., Fairchild, B. D., e Lacy, M. P. (2005). *Litter Quality and Broiler Performance*. University of Georgia.
- Roberts, S. A. (2009). *Effects of dietary corn distiller's dried grains with solubles on ammonia emission, production performance, manure characteristics, and economic efficiency for laying hens*. Ames, Iowa: Iowa State University.
- Rocha, J. C., Rosa, A. H., e Cardoso, A. A. (2004). *Introdução à Química Ambiental*. São Paulo: Artmed.
- Shimadzu, C. (2001). *PC-Controlled Total Organic Carbon Analyser, TOC-VCPH/CPN e TOC-Control V Software, User Manual*. Kyoto, Japão: Process e Environmental Instrumentation division.
- Shinde, S. (2013). Bioremediation. An overview. *Recent Research in Science and Technology*, 5, 67-72.
- Silva Pires, P. G., Ricci, G. D., e Mendes, J. V. (2013). Poultry litter Characteristis and Reutilization. *III Simpósio de Sustentabilidade e Ciência Animal*.
- Souza, V. L., Lemos, J. L., e Leite, S. G. (2008). *Emprego de Fungos Filamentosos na Biorremediação de Solos Contaminados por Petróleo: Estado da Arte*. Rio de Janeiro: Série Tecnologia Ambiental.
- Strader, R., Anderson, N., e Davidson, C. (2002). Obtido de User Guide - CMU NH3 Inventory, version 1.2: <http://www.envinst.cmu.edu/nh3/cmnh3userguide.pdf>.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K., (1999). Missing Lithotroph Identified as New Planctomycete. *Nature*, 40.
- Terry I, J. (2012). Bioaugmentation for wastewater systems. *Render Magazine*, pp. 10-12.

- Thompson, I. P., Gast, C. J., Ciric, L., e Singer, A. C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of. *Environmental Microbiology*, 7, pp. 909-915.
- Tortora, G., Funke, B., e Case, C. (2007). *Microbiology, an introduction, 9th edition*. Benjamin Cummings.
- US Environmental Protection Agency. (1995). Obtido de US Environmental Protection Agency. Toxic Release Inventory, 1995.: <http://www.epa.gov/tri/>
- Vogels, G. D., e Van Der Drift, C. (1976). Degradation of Purines and Pyrimidines by Microorganisms. *Bacteriological Reviews*, 40, pp. 403-468.
- Wang, Y. M., Meng, Q. P., Guo, Y. M., Wang, Y. Z., Wang, Z., Yao, Z. L., (2010). Effect of atmospheric ammonia on growth performance and immunological response of broiler chickens. *Journal on Animal and Veterinary Advances*, 2802-2806.
- Yahav, S. (2004). Ammonia affects performance and thermoregulation. INRA, EDP Sciences,.

Anexos



Anexos

Anexo I- Estudo da libertação de amoníaco na cama de aviário

Se seguida apresentam-se alguns dos resultados da análise das amostras retiradas em cada um dos estudos onde foi determinada a quantidade de amoníaco libertada da cama de aviário.

I.1. Estudo da volatilização do amoníaco em reactor com circulação de ar

Após o estudo da libertação de amoníaco na cama de aviário e da observação dos resultados obtidos, verificou-se que o sistema utilizado apresentava algumas falhas não sendo possível garantir os mesmos caudais nem a mesma quantidade de compostos azotados nos três reactores. As várias limitações observadas neste grupo de experiências conduziram a resultados muito instáveis e por esse mesmo motivo, optou-se por apresentar estes resultados nesta secção.

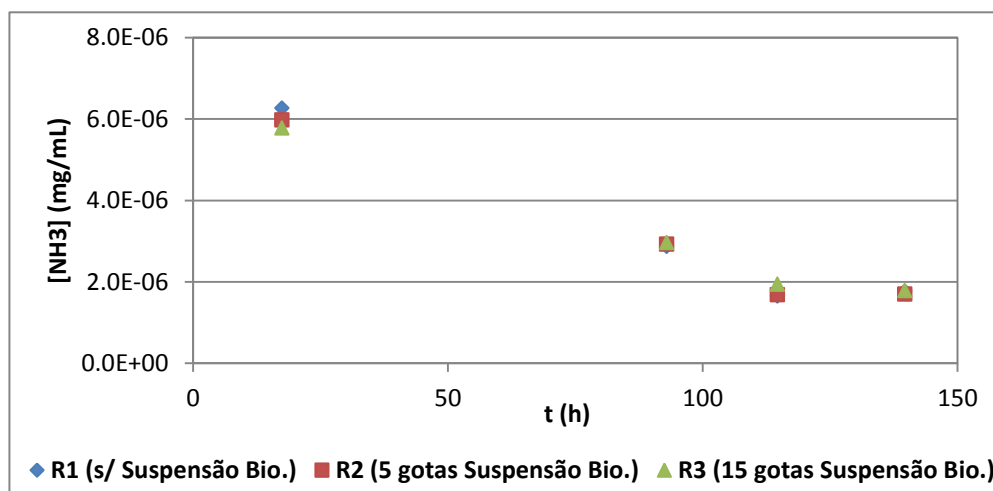


Gráfico I.1 - Resultados da libertação do gás amoníaco no reactor 1 isento de suspensão e no reactor 2 e 3 contendo 5 e 15 gotas de suspensão biológica

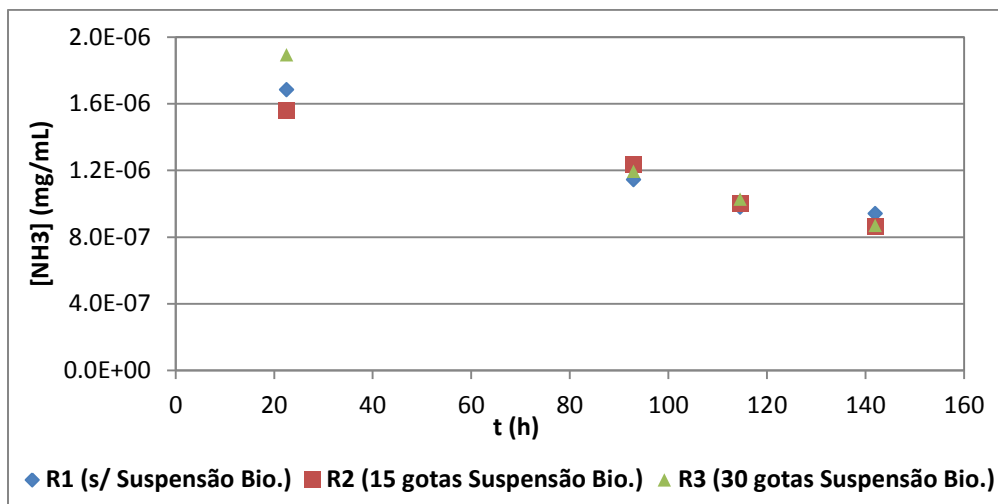


Gráfico I.2 - Resultados da libertação do gás amoníaco no reactor 1 isento de suspensão e no reactor 2 e 3 contendo 15 e 30 gotas de suspensão biológica

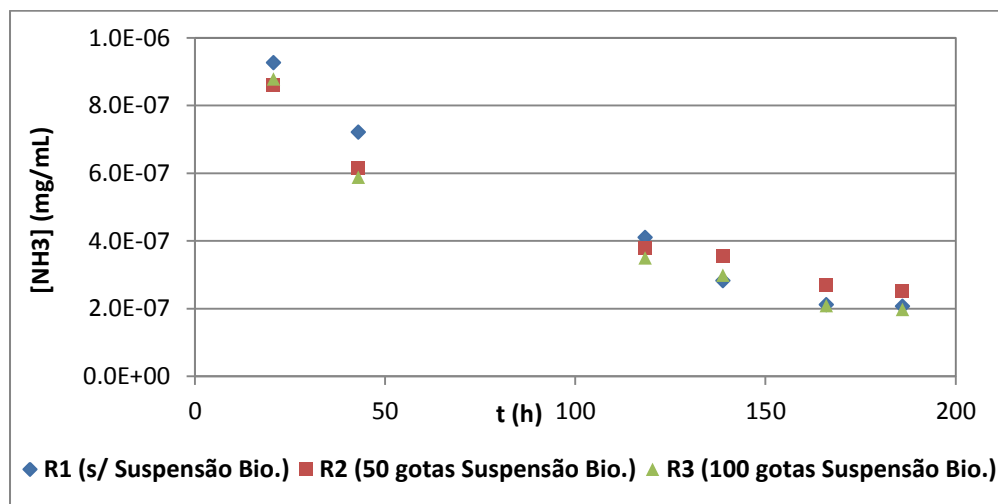


Gráfico I.3 - Resultados da libertação do gás amoníaco no reactor 1 isento de suspensão e no reactor 2 e 3 contendo 50 e 100 gotas de suspensão biológica

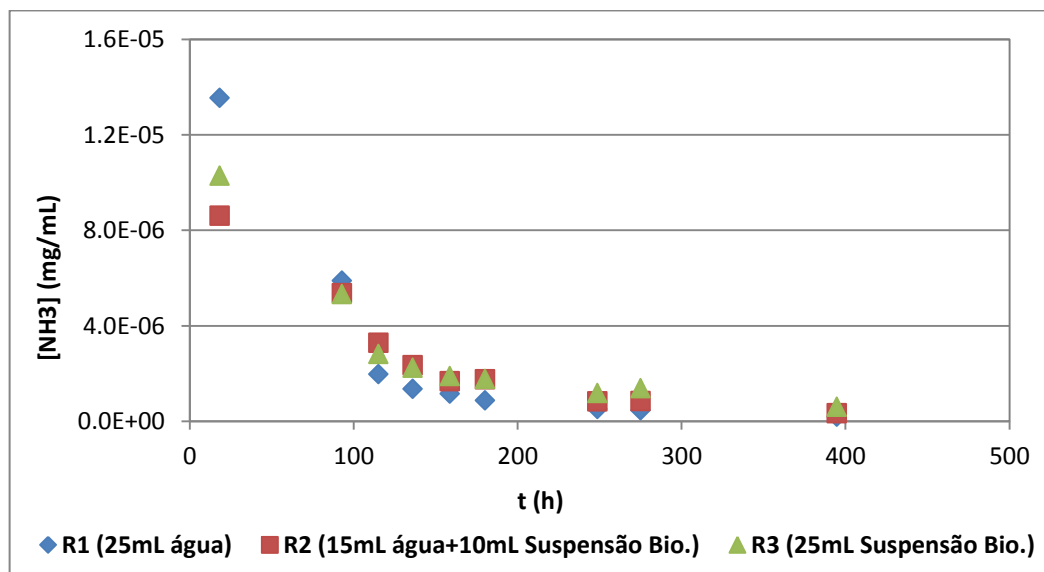


Gráfico I.4 - Resultados da libertação do gás amoníaco para o reactor 1 apenas com 25mL de água destilada, para o reactor 2 com 10mL de suspensão e 15mL de água destilada e para o reactor 3 com 25mL de suspensão.

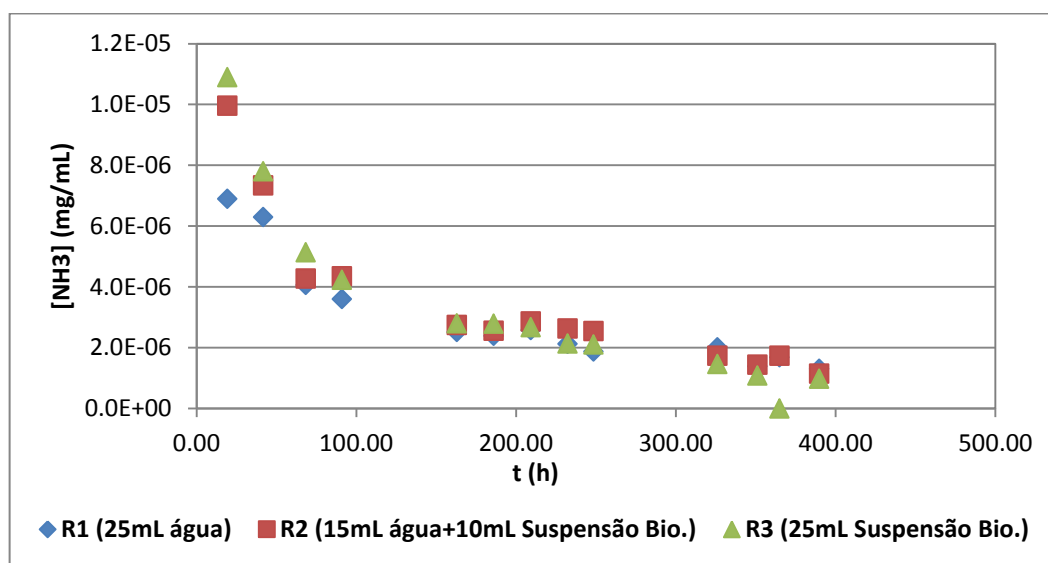


Gráfico I.5 - Resultados da libertação do gás amoníaco para a repetição do estudo com o reactor1 apenas com 25mL de água destilada, para o reactor 2 com 10mL de suspensão biológica e 15mL de água destilada e para o reactor 3 com 25mL de suspensão.

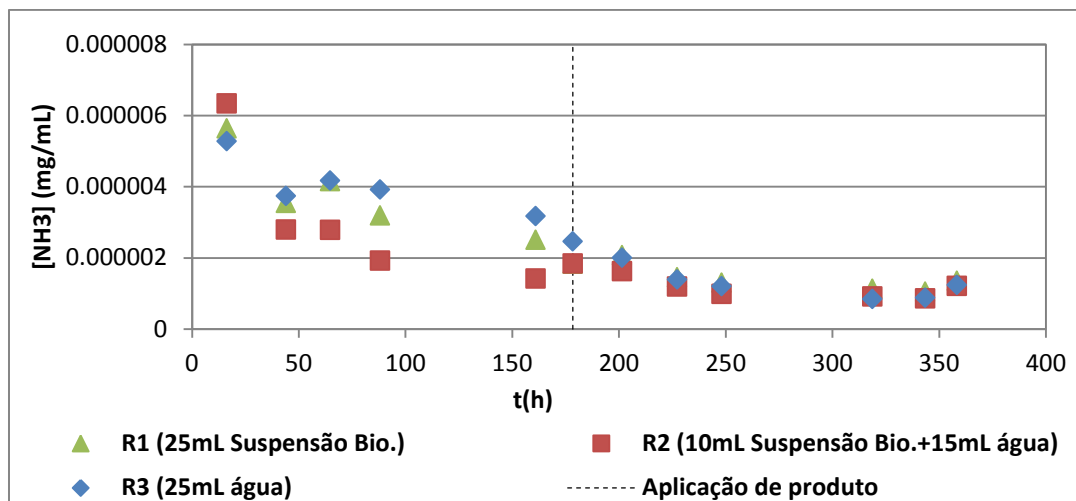


Gráfico I.6 - Representação da libertação do amoníaco nos três reactores, inicialmente sem aplicação de suspensão biológica até as 180h aproximadamente, e posteriormente com adição de suspensão três vezes por semana, com o reactor 1 apenas com 25mL de suspensão biológica, para o reactor 2 com 10mL de suspensão e 15mL de água destilada e para o reactor 3 com

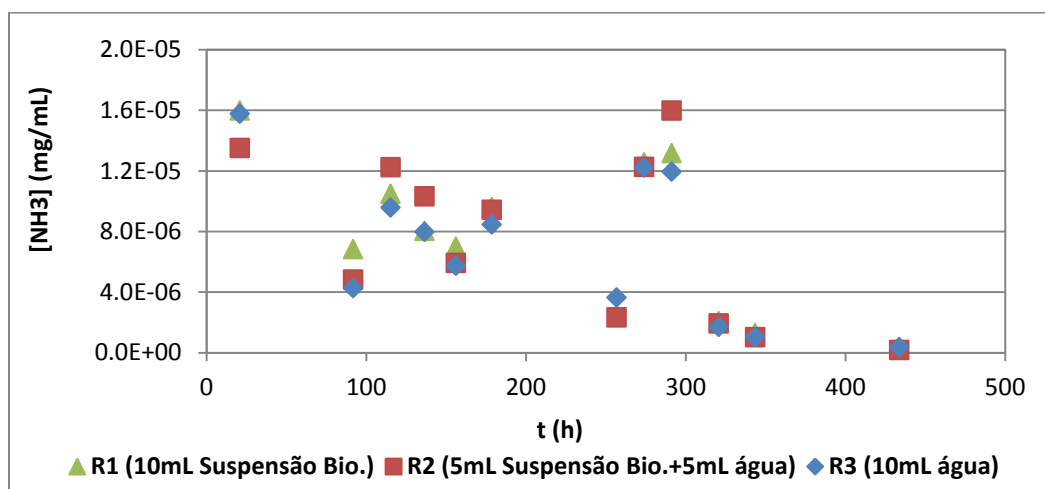


Gráfico I.7 - Representação da libertação de amoníaco nos três reactores com adição diária de suspensão e de 100gr de cama de aviário.

I.2. Estudo da volatilização do amoníaco em reactor fechado

Devido a algumas limitações do método utilizado neste trabalho, alguns dos resultados obtidos foram inconclusivos. Esses resultados encontram-se apresentados de seguida.

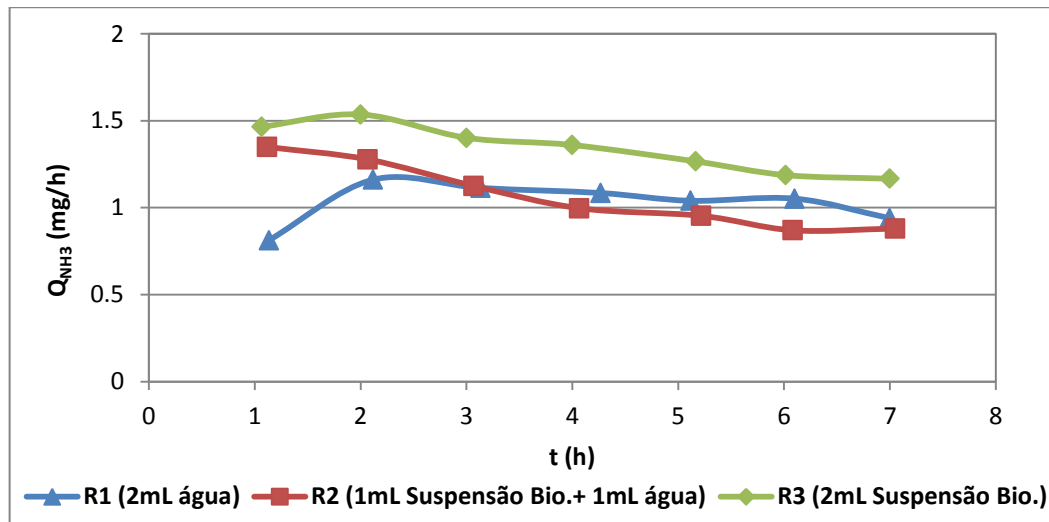


Gráfico I.8 - Representação do caudal mássico de amoníaco libertado ao longo do tempo nos ensaios realizados em reactores fechados contendo cama de aviário com 2mL água (R1), 1mL de suspensão biológica e 1mL de água e água (R2) e com 2mL de suspensão biológica (R3)

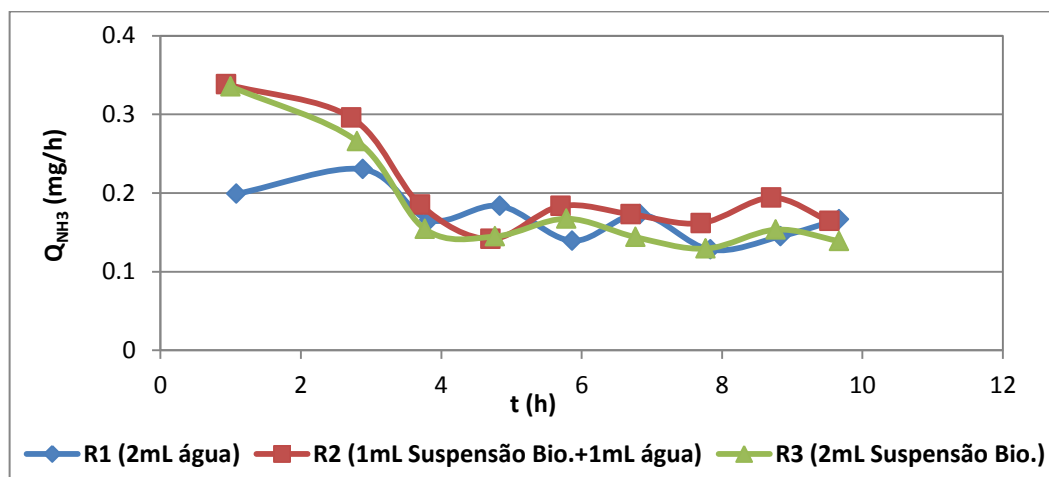


Gráfico I.9 - Representação do caudal mássico de amoníaco libertado ao longo do tempo nos ensaios realizados em reactores fechados contendo cama de aviário com 2mL água (R1), 1mL de suspensão biológica e 1mL de água e água (R2) e com 2mL de suspensão biológica (R3).

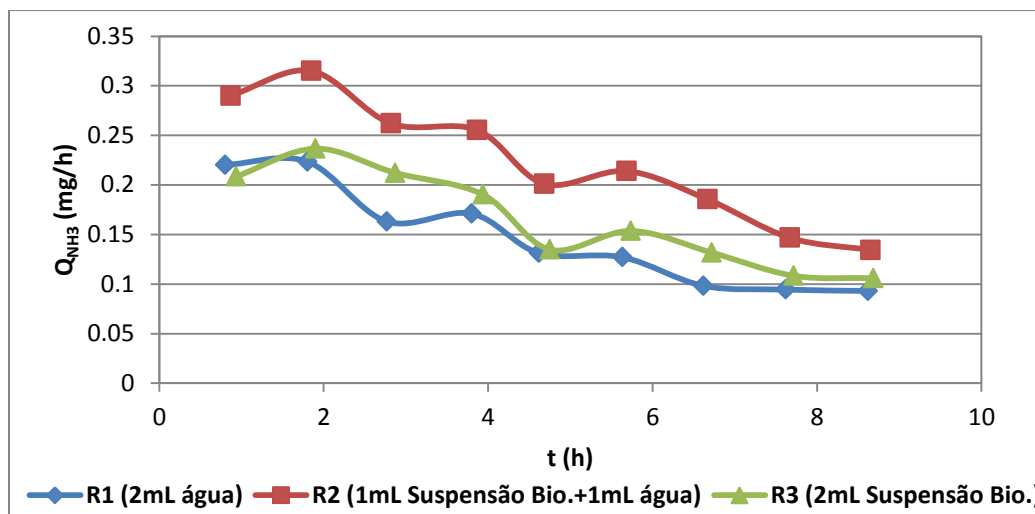


Gráfico I.10 - Representação do caudal mássico de amoníaco libertado ao longo do tempo nos ensaios realizados em reactores fechados contendo cama de aviário com 2mL água (R1), 1mL de suspensão biológica e 1mL de água e água (R2) e com 2mL de suspensão biológica (R3).

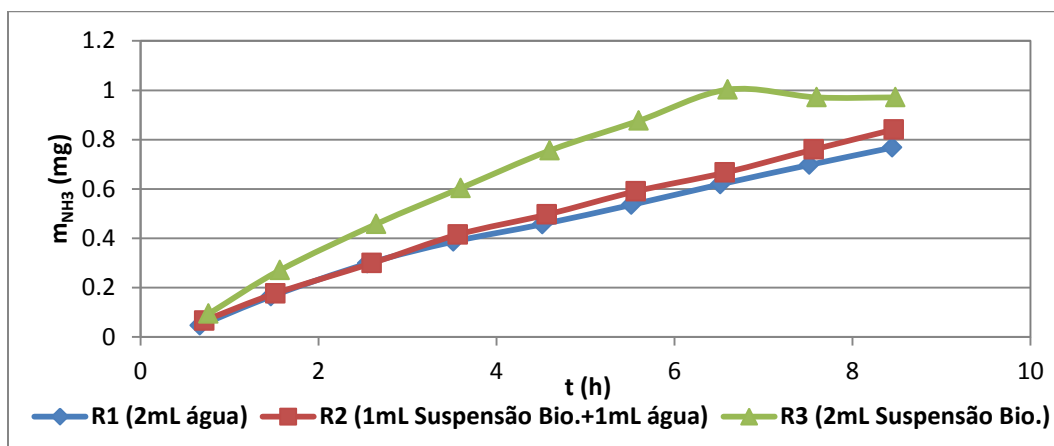


Gráfico I.11- Representação da massa de amoníaco libertado ao longo do tempo nos ensaios realizados em reactores fechados contendo cama de aviário com 2mL água (R1), 1mL de suspensão biológica e 1mL de água e água (R2) e com 2mL de suspensão biológica (R3).

Anexo II.- Informações da suspensão biológica JASS- BIO-SYSTEMS EUROPE®

De seguida é apresentada a ficha de informações da suspensão biológica em estudo.

BIO-SYSTEMS EUROPE®

Enigma Business Park, Spring Lane North, Malvern Link, Worcestershire WR14 1BU, England
Telephone: +44(0)1684 577171 Fax: +44(0)1684 892251

JASS

Biological formulation for the treatment of livestock beds

A liquid biological product containing stabilised bacteria, free enzymes and micronutrients that helps to maintain a high level of farm hygiene, suitable for all types of animal bedding especially cubicles and warm beds. Regular use will lower Ammonia levels reduce odours and improve the wellbeing of livestock.

JASS is highly effective in the sanitation of livestock beds. It works by out competing the existing bacteria for nutrients and humidity to establish a viable biomass that decomposes urine and excrement in a more preferential way. Breaking down the solid matter keeps bedding and animal legs cleaner.

JASS can be applied to bedding areas in open sheds and intensive farming systems where animal droppings cause a high environmental microbial load that accumulates and produces foul odours.

Application and usage rates:

- Dilute 1 Litre of JASS in 10 Litres of warm water to treat an area of 500m²
- Apply by nebuliser or back sprayer 3 times per week during the first 3 -4 weeks to establish a viable biomass.
- When the odours are at an acceptable level reduce the frequency of application gradually until a balance is met, this will depend on the type of bedding and animal stocking levels.

It is recommended that the dilution water is free of chlorine and other disinfectants that may inhibit the growth of the bacteria.

JASS is a formulation of Group 1 naturally occurring and appropriate non-pathogenic bacteria in very high concentrations.

JASS: SPECIFICATION

Form: Liquid
Colour: Light brown
Specific Gravity: 0.95 – 1.05
pH (20°C): 8.2 – 8.5
Contents: Selected micro-organisms, enzymes and micronutrients.
Packaging: 25 Litre polys

When used as directed **JASS** is completely safe. It is harmless to people, animals and the environment, and completely biodegradable.



BIO-SYSTEMS EUROPE is a trading name of MICROFERM LIMITED

E-mail: sales@biosystemseurope.co.uk Web: www.biosystemseurope.co.uk

Reg. In England No. 1947718

Anexo III.-Relatório Ezilimp

Neste anexo é apresentado o relatório de um trabalho efectuado por Guimarães e co-autores em que foram monitorizadas as condições ambientais do aviário e da cama de aviário e comparados estes dados com a dinâmica da população bacteriana total de enterobactérias nas camas de controlo e das que foram tratadas com Ezilimp, durante o ciclo de criação das aves.

Efeito do uso de ENZILIMP® AV como biodegradador de resíduos orgânicos em cama de aviários

GUIMARÃES, G., I.; LOPES, M.; SGARBOSSA, A., N; DIAS, S. C.; SILVA, M.S

Resumo

O objetivo desse experimento foi determinar a temperatura, o teor de umidade, pH, a população microbiana total e de enterobactérias da cama, a temperatura ambiente, a volatilização e intensidade da amônia, desempenho dos lotes de barracões com cama tratada com o produto ENZILIMP® AV, biodegradador de resíduos orgânicos para cama de aviários e cama sem tratamento. Foram utilizadas camas de aviários, em delineamento experimental, com dois tratamentos (1-cama não tratada = testemunha (CT) e 2- cama tratada com ENZILIMP® AV = CE). O tratamento da cama se deu nos dias 0, 10º, 20º e 30º do alojamento das aves.

As amostras da cama foram coletadas no 7º, 20º e 34º dia da instalação do lote. Não houve influência do produto sobre a umidade, entretanto, sua adição reduziu o valor de pH, a quantidade de amônia volatilizada da cama de frango, bem como reduziu a contagem de bactérias totais e de enterobactérias na cama tratada. Durante o experimento, foram observados resultados indicativos da contaminação pelo produto da cama do aviário controle, detectando-se a redução. Conclui-se que o ENZILIMP® AV pode ser adicionado a cama, promovendo redução no pH e na perda de nitrogênio por volatilização da amônia.

Palavras –chave: ENZILIMP® AV, amônia, cama de frango, umidade

Study of the dry matter content, pH, the volatilized ammonia and microbial population from the poultry litter treated with ENZILIMP® AV

Abstract

The aim of this experiment was determine the temperature, moisture, pH, microbial population and enterobacteriaceae of the poultry litter, environment temperature, volatilize of ammonia, discharge of lot with litter treated with ENZILIMP® AV, biodegrade of organics residues to poultry litter and litter without treatment. Two litter poultry were used, in randomized design, with two treatments (1- litter not treated (TC) and 2 – litter treated with ENZILIMP® AV= CE). The treatment of poultry litter happened in the day 0, 10º, 20º and 30º accommodation of the poultry.

The samples of poultry the litter were collected in the 7º, 20º e 34º day of the accommodation of lot. There was no influence of the product about the moisture, however, the **gypsum** reduced the pH value and the quantity of volatilized ammonia from the poultry litter and happened decrease the count of the total bacterium and enterobacteriaceae in the poultry litter treated. During the experiment were observed results indication of contamination through of product in the poultry litter control. It can conclude that ENZILIMP® AV can be added to the poultry litter, promoting a reduction in the pH and in the losses of nitrogen by ammonia volatilization.

Key words: ENZILIMP® AV, ammonia, poultry litter, moisture.

Introdução

A cama de aviário consiste na mistura de excretas (fezes e urina), com o material utilizado como substrato para receber e absorver a umidade da excreta (maravalha, serragem, palhas de cereais, feno de capim picado, casca de arroz, etc.), penas e descamações da pele de aves e restos de alimento que caem dos comedouros (BELLAYER; PALHARES, 2003).

A cama deve ser manejada para controlar o nível de umidade, a produção de amônia, a exposição das aves a agentes produtores de enfermidades e para prevenir a proliferação de insetos. Além disso, a cama tem como função a absorção de umidade, incorporação das fezes e penas, manutenção térmica do galpão e evitar o contato direto da ave com o piso (NOLL, 1992; GIROTTO e ÁVILA, 2003).

A cama excessivamente úmida causa uma série de prejuízos às aves. Dentre esses, deve-se assinalar as dermatites ulcerativas como produtoras de lesões nas aves que, poderão posteriormente, depreciar as carcaças. Os frangos passam a maior parte do tempo descansando sobre a cama e segundo as suas condições poderão ocorrer dermatites ocasionadas pela abrasividade, amônia e calor. Todos os fatores que propiciam cama úmida contribuem com as dermatites, dentre estes a densidade de aves. Segundo a densidade, poderão aumentar os índices de quebra de bebedouros que proporcionam vazamentos de água, aumentando a umidade da cama, além do tipo de material da cama (ABREU; ABREU, 2002).

Existem ainda, fatores dentro do galpão que podem trazer prejuízos às aves e riscos a saúde dos trabalhadores avícolas. A maioria dos criadores desconhece as perdas ocasionadas pela concentração de amônia em seus galpões. A amônia é um gás incolor e irritante às mucosas, sendo formado a partir da decomposição microbiana do ácido úrico eliminado pelas aves. Os níveis de amônia até 50 ppm não são considerados como nocivos pelos criadores. Teoricamente, o olfato humano não detecta a presença de amônia em níveis abaixo de 20ppm. Além disso, os humanos perdem a sua sensibilidade olfativa depois de longas exposições ao mesmo odor, dessa forma, as aves são afetadas muito antes que o problema seja percebido ou identificado por seus criadores (LOTT; DONALD, 2003). Pessoas que trabalham com frango apresentam alta incidência de sintomas agudos e crônicos de tosse, irritação nos olhos, fadiga, congestão nasal, espirro, dor de cabeça, irritação na garganta e febre (DONHAM, 2000).

Quando a quantidade de amônia inalada é superior a 60 ppm, a ave fica predisposta a doenças respiratórias aumentando os riscos de infecções secundárias após as vacinações. Quando o nível de amônia ambiente atinge 100 ppm, há redução da taxa de profundidade da respiração prejudicando os processos fisiológicos de trocas gasosas. Esses altos níveis de amônia (60 a 100ppm) podem ser detectados pelo olfato humano no início da criação em galpões quando se adota a reutilização da cama (GONZÁLES; SALDANHA, 2001).

Pesquisas feitas nos últimos 20 anos têm mostrado que níveis de amônia em torno de 50ppm causam serias perdas no desempenho, bem como níveis de 25ppm que também ocasionam perdas significativas na performance das aves. Além da redução de peso das aves, muitas apresentam lesões nos olhos, com agravamento para um quadro de cegueira. Com 50ppm, a amônia já é capaz de destruir alguns cílios (presentes nas vias respiratórias para expelir corpos estranhos inalados), desencadeando uma série de lesões no organismo das aves. Os casos mais comuns decorrem do alojamento e desenvolvimento de bactérias do tipo *E.coli* na traquéia resultando em uma infecção das vias aéreas (LOTT; DONALD, 2003).

A formação da amônia nos aviários requer três fatores: os dejetos, o calor e a umidade. Provavelmente, o mais importante destes fatores, dentro do manejo de cama seja o controle de umidade. Mesmo com a utilização de produtos para o controle de amônia, um mínimo de ventilação deve ser cuidadosamente mantido para remover uma parte da umidade dos aviários. Se a ventilação for reduzida abaixo da recomendada, a umidade aumentará dentro do galpão e na forração, incrementando a produção da amônia e da sua concentração no barracão por não estar ocorrendo a necessária exaustão. Desta forma, a eficiência dos produtos utilizados para o controle na produção de amônia será prejudicada ou mal avaliada. Consequentemente teremos um bom controle de amônia nos primeiros dias e nenhum no restante do período de alojamento (www.aviculturaindustrial.com.br). Assim, os objetivos deste experimento foram determinar o teor de fatores ambientais e da cama como a temperatura e a umidade relativa do ar, bem como o pH, a temperatura e a umidade da cama, amônia volatilizada, comparando estes dados com a dinâmica da população bacteriana total e de enterobactérias nas camas, controle e tratada com ENZILIMP® AV, durante o ciclo de criação das aves.

Material e Métodos

O experimento foi conduzido na granja comercial localizada no município de Mandaguçu-PR, no período de outubro a novembro de 2005.

Foram utilizados 23.000 pintainhos, de linhagem pesada com 1 dia de idade, ambos os sexos, com peso médio inicial de 44 ± 2 gramas, alojados em dois galpões de alvenaria de 1.500 m², divididos em 2 boxes cada. Adotou-se a densidade de 15,46 aves/m².

O material utilizado como cama em todos os tratamentos foi a palha de arroz, usado nos boxes sempre na quantidade de 8 ton/m² com 6 cm de espessura. As camas dos 2 galpões não tinham sido utilizadas anteriormente.

O delineamento experimental teve dois tratamentos (1-cama não tratada = testemunha (CT) e 2-cama tratada com ENZILIMP® AV = (CE)). O produto foi pulverizado na quantidade de 2 kg em quatro etapas: dia 0 – 1ª aplicação (2 horas antes do alojamento dos pintainhos); dia 10 – 2ª aplicação; dia 20 – 3ª aplicação; dia 30 – 4ª aplicação.

As colheitas das amostras da cama para as análises de umidade, pH, amônia e pesquisa de microrganismos produtores de urease foram realizadas no 7º, 20º e 34º dia de instalação do lote. As amostras foram retiradas de três pontos fixos de cada box estrategicamente escolhidos, sendo coletadas 4 amostras de cada ponto, evitando-se as áreas próximas e embaixo do comedouro e do bebedouro, totalizando 12 amostras de cada box. Posteriormente estas amostras foram homogeneizadas e armazenadas em vidros estéreis.

A umidade da cama foi determinada pelo método de estufa a 100°C por 3 horas, o pH através de pH-metro e a temperatura da cama e do ambiente através de termômetro digital.

No laboratório de Medicina Aviária da Universidade Estadual de Londrina, as 4 amostras correspondente de cada ponto foram homogeneizadas e transformadas em uma única amostra. Em seguida, as três amostras finais de cada box foram divididas em duas partes iguais: a primeira foi destinada à pesagem e secagem e a segunda foi colocada em vidros esterilizados contendo água peptonada, sendo submetidos à homogeneização por cinco minutos e um minuto de repouso. Em seguida procedeu-se

às diluições seriadas em solução salina fisiológica (pH 7,0) esterilizada. Posteriormente, as amostras foram semeadas em duplicatas em placas de Ágar para Contagem Padrão (PCA), sendo incubadas a 37°/24-48 horas. Com as diluições seriadas procedeu-se também a semeadura em Ágar Sangue e McConkey a 37°/24h. Colônias com diferentes características do Ágar McConkey foram submetidas à prova bioquímica da Urease (35-37°C/18 a 24 horas).

Os teores de amônia nos barracões foram avaliados por análise sensorial, levando-se em consideração o impacto da amônia quanto o olfato-odor, sintomas nos galpões e nas aves. Foi considerado o histórico da granja em relação a sinalização sensorial do problema pelos funcionários e sintomas ou mal estar, observação clínica e performance dos lotes e reclamações da vizinhança. Foi estabelecido um placar considerando os eventos relacionados e o seu nível de intensidade ou de percepção dos sinais. Foram anotadas as observações realizadas durante as tomadas de amostras das camas de CE e CT:

- 0 sem percepção
- 1 leve percepção
- 2 forte percepção
- 3 forte percepção e mal estar dos galpões
- 4 forte percepção, mal estar e sintomas nas aves
- 5 percepção na vizinhança

Resultados e Discussão

De acordo com os resultados encontrados não houve interferência do pH e da temperatura da cama, bem como da temperatura e umidade do ambiente sobre a amostragem analisada (Tabela 1; Tabela 2). Os valores quando comparados de CE e CT não sofreram variações significativas.

Pode se observar nos dois tratamentos, que na 3ª amostragem, 34º dia, o pH e a umidade aumentaram, mas a temperatura declinou, devido a chuvas no período. A alta da umidade no meio ambiente e na cama contribuiu com o aumento da população bacteriana e a produção da amônia, porém não foi detectada pela análise sensorial no CE e CT. No entanto, observando a contagem de colônias no McConkey, onde também crescem as bactérias urease positivas, o declínio de crescimento bacteriano na CE chama a atenção e na CT o declínio ocorreu em menor intensidade.

Tabela 1. Médias da temperatura, pH e relação peso/umidade da cama testemunha (CT), umidade e temperatura do ambiente observados nas três coletas.

Coleta	T°C cama	pH cama	U % ambiente	T°C ambiente	Relação peso/Umidade da cama %
1ª	31	7,72	70	31,2	27,91
2ª	28,6	8,24	70	27,5	26,96
3ª	30	9,32	82	20,8	34,39

Tabela 2. Médias da temperatura, pH e relação peso/umidade da cama tratada com Enzilimp® AV (CE), umidade e temperatura do ambiente observados nas três coletas.

Coleta	T°C cama	pH cama	U % ambiente	T°C ambiente	Relação Peso/Umidade da cama %
1ª	30,3	8,04	70	31,2	27,61
2ª	29,6	8,20	71	27,4	46,78
3ª	29	9,23	80	19,7	34,26

Tabela 3. Médias das contagens de bactérias no Ágar PCA, Ágar McConkey e Ágar Sangue encontradas nas coletas da cama tratada com Enzilimp® AV(CE).

Coleta	Ágar PCA	Agar McConkey	Ágar Sangue
1ª	424	187	181
2ª	449	94 *	181
3ª	128	22	92

*A umidade da cama tratada apresentou um valor 57,6% acima da CT.

Tabela 4. Médias das contagens de bactérias no Ágar PCA, Ágar McConkey e Ágar Sangue encontradas nas coletas da cama testemunha (CT).

Coleta	Ágar PCA	Agar McConkey	Ágar Sangue
1ª	334	43	181
2ª	291	168	181
3ª	290	70	148

Observando os resultados de análise sensorial, as provas realizadas não detectaram níveis que atingissem o valor 3, 4 e 5. O comportamento do crescimento no Ágar McConkey e Ágar Sangue, na segunda e terceira coleta se visualiza a eficácia do produto, com maior nitidez em relação as bactérias de crescimento em Ágar McConkey. Soma-se a esta observação, o fato de que as condições da CT não sofreram as variações da umidade da CE observada na 2ª coleta. Há indícios de interferência do produto na CT, como se vê pelos índices de inibição de crescimento na 3ª coleta, em Ágar PCA, Ágar McConkey e Ágar Sangue.

Da leitura dos resultados da 1ª para a 3ª coleta da CE houve diminuição na contagem microrganismos no Ágar PCA quando comparada com a da CT. Em relação à contagem de bactérias no Ágar McConkey se observou uma diminuição acentuada na CE, assim como na contagem do Ágar Sangue (Tabela 3; Tabela 4). A umidade da cama em CE na 1ª coleta foi de 27,6% e na CT de 27,9%, praticamente o mesmo índice em ambas.

Já na 2ª coleta a umidade da cama de CE apresentou índice de 46,7%, tendo ocorrido um incremento de 69%, e da CT 26,9%, o que demonstrou a variação das condições ambientais de cada um dos galpões. A contagem de colônias em Ágar McConkey foi nitidamente menor na CE em relação à CT (94<168) apesar do seu nível de umidade ter aumentado, e no Ágar PCA se observou o inverso, ou seja, onde estava mais úmido 46,7% na CE, cresceram mais bactérias, 449 colônias, e na CT com 26,9% de umidade apenas 291 colônias. Isto comprovou, observando o crescimento no Ágar PCA, que o incremento de 69% no índice de umidade da CE, permitiu o crescimento de bactérias, porém apenas de 5%, ou seja, de 424 na 1ª coleta para 449 na 2ª, caindo na 3ª coleta para 128. Portanto, mesmo com mais umidade o tratamento foi eficaz em relação as bactérias que crescem em Ágar McConkey dentre elas as urease positivas produtoras de amônia e as que crescem em PCA. O efeito inibidor do tratamento em CE também foi evidenciado no crescimento em Ágar Sangue, respectivamente 181 na 1ª, 181 na 2ª e 92 na 3ª coleta. Os resultados de CT também apontam o efeito do tratamento, face ao escape do produto de CE para CT devido a práticas de manejo.

A formação da amônia nos aviários requer três fatores: os dejetos, o calor e a umidade. Provavelmente, o mais importante destes fatores, dentro do manejo de cama seja o controle de umidade (www.aviculturaindustrial.com.br).

Conclui-se, portanto, que mesmo aumentando a umidade e com maior crescimento, o produto inibiu bactérias no Ágar McConkey. Observando o crescimento pareado em Ágar PCA, pode se inferir o efeito positivo do ENZILIMP® AV. Seguindo os resultados da 3ª coleta, o fato se repete nas placas de McConkey, porém chama a atenção o fato de que apesar da umidade ter aumentado em ambos os tratamentos, o crescimento não se acentuou no CT, pois foi observado o escape do produto aplicado na CE para CT devido a práticas de manejo adotadas, tais como as mesmas botas, a mesma roupa, os mesmos garfos de virar cama, práticas que se intensificam no decorrer do alojamento.

De acordo com KOERKAMP et al., 2000, os parâmetros mais importantes para se avaliar a qualidade do ar em um galpão são a presença de odores, os níveis de amônia no ar e a concentração de pó, de patógenos no pó e de gás sulfídrico, que podem prejudicar a saúde tanto das aves quanto dos seres humanos. Em determinadas circunstâncias, a aplicação de produtos inibidores da produção de amônia no ambiente por bactérias urease positivas, trazem resultados benéficos ao bem estar das aves, dos galponeiros e vizinhança, como ficou demonstrado pelo uso do Enzilimp® AV, mesmo em circunstâncias favoráveis a proliferação das bactérias pelo aumento da umidade ambiente que se verificou devido a questões relativas a localização e terraplanagem e outros fatores não investigados do aviário CE durante a 2ª coleta e a mudanças climáticas, chuva, durante a 3ª coleta.

A diminuição no número de bactérias encontradas no Ágar McConkey durante as coletas se refletiu na análise sensorial realizada nos galpões pelos funcionários. No galpão CE não ocorreu sensibilidade em nível 2 ao final do experimento, sendo que no CT ocorreu. Estes trabalhadores sentiram diminuição no odor de amônia dentro do boxe em tratamento com ENZILIMP® AV e mesmo em relação ao CT o nível detectado não ultrapassou o índice 2, somando-se o fato de que a vizinhança também não a percepção do cheiro que se desprendia dos barracões. Isto pode ser explicado pela realização da série bioquímica com as colônias transferidas para o Caldo Urease. As bactérias urease positivas são produtoras de uréia que se desdobram em amônia na cama de frango produzindo o odor característico dentro do boxe. Estas bactérias crescem no Ágar McConkey na temperatura de 35-37°C.

O produto Enzilimp®AV é uma mistura de microrganismos em forma de esporos, composto por *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* e *Bacillus polymyxa*, numa concentração mínima de 8×10^7 UFC por grama do produto. Seu modo de ação em relação as Urease positivas é de competição pelo substrato. Portanto, considerando os dados dos achados nas contagens em Ágar McConkey na 2ª e 3ª tomadas de CE pode se estabelecer uma correlação positiva. Igualmente, como foi mencionado, ocorreu o escape da microbiota contida no produto para o barracão/cama controle CT. Este fato contribuiu para deprimir a contagem dos microorganismos isolados em Ágar McConkey, em menor intensidade do que ocorreu em CE. Deve ser chamada a atenção para a uniformidade dos fatores ambientais medidos em ambos os tratamentos durante o experimento, o que demonstra que um outro fator influenciou a população de bactérias urease positivas, que crescem em Ágar McConkey com menos competição como no Ágar Sangue e Ágar PCA, e que a sua população foi deprimida por uma competição exclusiva. Isto também serve para demonstrar que o mesmo efeito, em menor intensidade, ocorreu no controle.

Considerando as observações de LOTT; DONALD, 2003 em relação a detecção de amônia em níveis abaixo de 20ppm e de DONHAM, 2000, que considera que pessoas que trabalham com frango apresentam alta incidência de sintomas agudos e crônicos de tosse, irritação nos olhos, fadiga, congestão nasal, espirro, dor de cabeça, irritação na garganta e febre, pode-se inferir que os resultados da análise sensorial comprovaram a diminuição dos níveis de amônia e do seu impacto na CE, nas aves, nos galpões e vizinhança.

A melhora em relação a análise sensorial em CT se deu graças ao escape do produto ENZILIMP®AV, por meio de práticas de manejo. Considerando a memória das observações sensoriais de lotes anteriores e o impacto que se detectava junto a vizinhança, se conclui que a melhora foi acentuada. Considerando os relatos do experimento da análise sensorial em relação a amônia tais como a sua detecção, porém sem sintomas nas aves e ou galpões, pode-se considerar que os seus níveis se situaram em torno de 60 ppm, o que está de acordo com GONZÁLES; SALDANHA, 2001.

Conclusão

O produto ENZILIMP®AV é eficiente no controle de microbiota produtora de amônia, podendo ser utilizado para o controle de níveis de amônia em aviários.

O presente modelo experimental de campo comprovou a sua validade para avaliar a eficiência de produtos de microbiota de competição exclusiva para o controle de bactérias produtoras de amônia no meio ambiente. Estabeleceu que a análise concomitante dos dados relativos a temperatura ambiente, temperatura da cama, umidade, pH da cama, crescimento bacteriano em Ágar Sangue, Ágar PCA e Ágar McConkey, provas de urease e análise sensorial em relação a avaliação de níveis de amônia, teve correlação positiva com o índice de inibição de bactérias produtoras de amônia ou urease positivas / sua eficiência, mesmo com variáveis climáticas e de instalações.

Bibliografia

ABREU, V., M., N.; ABREU, P., G. Qualidade de carcaça e o manejo na produção. *Avicultura Industrial* 93 (1101): 12-16.

http://www.aviculturaindustrial.com.br/site/dinamica.asp?id=5098&tipo_tabela=cet&categoria=manejo. Acesso em 15 de março de 2007.

BELLAVER, C.; PALHARES, J., C., P. Uma visão sustentável sobre a utilização da cama de aviário. *Avicultura Industrial* 94 (1113): 14-18.

DONHAM, K., J. Occupational health hazards and recommended exposure limits for workers in poultry building. In: PROCEEDING NATIONAL POULTRY WASTE MANAGEMENT SYMPOSIUM, 2000, Auburn. **Proceedings...** Auburn: Auburn University, 2000, p.92- 109.

GIROTTI, A., F.; AVILA, V., S. 2003. Cama de aviário. *Avicultura Industrial* 94 (1114): 14-15.

KOERKAMP, P. W. G. G.; MIDDELKOOP, J. H. VAN.; ELLEN, H. H. Air quality management and requirements in Europe. In: PROCEEDING NATIONAL POULTRY WASTE MANAGEMENT SYMPOSIUM, 2000, Auburn, **Proceedings...** Auburn: Auburn University, 2000, p.72-79.

LOTT, B.; DONALD, J. 2003. Amônia. *Avicultura Industrial* 94 (1111): 34-36. Porto Feliz-SP.

NOLL, S.L. 1992. In: *Profesional* 10(1):42-43.

Os primeiros dias de vida do frango e a produtividade futura. In: CONGRESSO BRASILEIRO de ZOOTECNIA, 1, 2001. Goiânia. **Anais...** Goiânia: AZEG/ABZ, 2001, p.312-313.

Anexo IV.- MicroTreat™ "P"

Neste anexo é apresentada a ficha de segurança do produto MicroTreat "P" e algumas informações referentes a este produto.

Anexo IV.1.- Ficha de segurança do MicroTreat™ "P"

MATERIAL SAFETY DATA SHEET <small>Complies with OSHA Communication Standard (29CFR 1910.1200)</small>					
Product Name: MicroTreat "P"		Item Number: 045413			
SECTION I - GENERAL INFORMATION					
Manufacturer's Name:	Agtech Products, Inc. W227 N752 Westmound Dr. Waukesha, WI 53186	Telephone Number for Information: (262) 521-1717			
Trade Name and Synonyms: MicroTreat "P"					
Chemical Name:					
Formula: Proprietary-	Active: <i>Propionibacterium jensenii</i> , <i>Bacillus subtilis</i> <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i>				
	Inert carriers- sugar, maltodextrin				
SECTION II - HAZARDOUS INGREDIENTS					
Substance	Approx. %	OSHA PEL	ACGIH TLV	Carcinogenicity	CAS No.
CONTAINS NO HAZARDOUS COMPONENTS AS LISTED IN 29 CFR 1900.1000 OR OTHER PERTINENT SECTIONS OF OSHA REGULATIONS. PRODUCT IS GRAS FOR HUMAN CONSUMPTION 21CFR 184.1444					
SECTION III - PHYSICAL DATA					
Boiling Point: NA		Specific gravity: NA			
Vapor Pressure (mm Hg): NA		% Volatile (volume %): NA			
Vapor Density (air=1): NA		Evaporation Rate (water=1): NA			
Solubility in water: soluble		pH: NA			
Appearance and Odor: light tan powder, no discernable odor					
SECTION IV - FIRE AND EXPLOSION HAZARD DATA					
Flash Point (F°):		Non-flammable (test method): Closed cup		Flammable limits in air (volume %):	
Extinguishing Media:		Water, Foam, Carbon Dioxide, Dry Chemical		Upper: NA Lower: NA	
Special Fire Fighting Procedure: None					
Unusual Fire and Explosion Hazard: None					
SECTION V - REACTIVITY DATA					
Stability: Stable		Conditions to Avoid: None			
Incompatibility: Chemical sanitizers					
Hazardous Decomposition: None					
Hazardous Polymerization: Will not occur					
SECTION VI - HEALTH HAZARD DATA					
Threshold Limit Value: Not Established					
Primary Route of Exposure: Inhalation - as dust. Skin - no hazard. Ingestion - no hazard					
Effects of Overexposure: none					
Emergency and First Aid Procedures: Rinse mouth, skin, flush eyes with water					

MicroTreat® "P"

Litter Management....

....A key to optimizing bird performance

Product Overview

MicroTreat® "P" is a patented biological litter treatment product to control the decomposition of poultry litter.

How It Works

MicroTreat® "P" is composed of five microorganisms selected for their ability to lower water activity, pH and inhibit gram-negative bacteria in the litter.

Benefits of MicroTreat® "P"

- Improved bird performance
- Drier litter
- Less tilling
- Cleaner birds
- Reduced caking
- Reduced ammonia

Features of MicroTreat® "P"

- Easy to use
- Proven technology
- Technically supported

Methods of Application

- Medicator - drinking water
- Tank Sprayer
- Weeden Sprinkler Systems
- Gilmore Hose Applicator

When to Use MicroTreat® "P"

- Application should take place as soon as possible after birds are placed in the house.
- If cleaning, disinfecting or using an insecticide on the litter, please wait 24 hours before application of *MicroTreat® "P"*.
- Application should take place after the brood or "fresh litter" has been top-dressed.
- *MicroTreat® "P"* application should be repeated with each flock placement.



140 Jacob Street, Suite #15
Tavistock, ON N0B 2R0

Ph: 1-800-552-1064

